

明 細 書

N-O結合性架橋構造型新規人工核酸

技術分野

- [0001] 本発明は、安定で優れたアンチセンスもしくはアンチジーン活性、又は特定遺伝子の検出薬若しくは増幅開始の為のプライマーなどとして優れた活性を有し、また、各種の生理・生物活性物質類、医薬品類の材料、RNA干渉法(RNAiあるいはsiRNA)やデコイ法用などの二重鎖オリゴヌクレオチドの機能性材料、cDNAなど一本鎖核酸を標的とするDNAチップ、モレキュラービーコン(molecular beacon)などの機能性素材、様々なアンチセンス法(リボザイム、DNAザイムを含む)、アンチジーン法や遺伝子相同組み換え法用途への機能性素材、蛍光や発光物質との組合せによる生体微量成分の高感度分析用材料などとして有用な、オリゴヌクレオチド類縁体及びその製造中間体であるヌクレオシド類縁体に関する。

背景技術

- [0002] 1978年アンチセンスオリゴヌクレオチド(アンチセンス分子)がインフルエンザウィルスの感染を阻害したとの報告が初めてなされた。以後、ガン遺伝子発現やAIDS感染を阻害したとの報告もなされている。アンチセンスオリゴヌクレオチドが望ましくない遺伝子の発現を特異的に制御することから、医薬品として近年、最も期待されている分野のうちの一つである。
- [0003] アンチセンス法とは、DNA→mRNA→タンパク質という、いわゆるセントラルドグマの一連の流れをアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて制御しようという概念に基づいている。
- [0004] しかしながら、天然型DNAやRNAオリゴヌクレオチドをアンチセンス分子としてこの方法に適用した場合、生体内の酵素により加水分解を受けたり、細胞膜透過性が高くないなどの問題が生じた。そしてこれらを解消するために核酸誘導体が数多く合成され、研究が重ねられてきた。例えば、リン原子上の酸素原子をイオウ原子に置換したホスホロチオアート、メチル基に置換したメチルホスホナート、また最近になっては、リン原子も炭素原子で置換したものやリボースを非環式骨格にした分子も合成され

ている(F. Eckstein et al., Biochem., 18, 592(1979); P.S.Miller et al., Nucleic Acids Res., 11, 5189 (1983); P.Herdewijn et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1567 (1993); P.E. Nielsen et al., Science, 254, 1497 (1991)); C.A. Stein and A.M. Krieg (ed) "Applied Antisense Oligonucleotide Technology," Willy-Liss (1998); J.J. Toulme et al., Prog. Nucl. Acid Rev. Mol. Biol., 67, 1 (2001)など。

- [0005] しかし、いずれの人工オリゴヌクレオチド類の場合も、一本鎖RNAやDNAに対する二重鎖形成能、二重鎖DNAに対する三重鎖形成能、生体内での安定性またはオリゴヌクレオチドの合成の容易さ等の点で十分に満足のいくヌクレオシドおよびオリゴヌクレオチド類縁体が得られていない。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] このような従来技術に鑑みて、生体内で細胞膜透過性が高く、酵素の加水分解を受けにくく、しかも合成が容易であり、アンチセンス法、アンチジーン法、RNA干渉法、遺伝子相同組み換え法、デコイ法などに有用なヌクレオチド類縁体が提供されることが望まれている。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明の発明者等は、各種の生理・生物活性物質類、医薬品類の材料、RNA干渉法(Nature, Vol. 411, 494-498, 2001)、デコイ用二重鎖オリゴヌクレオチドの機能性材料、cDNAなど一本鎖核酸を標的とするDNAチップ、モレキュラービーコン(molecular beacon)などの機能性素材、様々なアンチセンス法(リボザイム、DNAザイムを含む)、アンチジーン法や遺伝子相同組み換え法用途への機能性素材、蛍光や発光物質との組合せによる生体微量成分の高感度分析用材料などとして有用であろう、核酸の糖部分を修飾した核酸類縁体(人工核酸)を設計し、それを合成してその有用性を確認した。
- [0008] 後の実施例及び実験例で詳細に説明するように、本発明の一種である人工核酸2',4'-BNA^{NC}ユニット[一般式(I)で、R₁とR₂が水素、R₃が水素あるいはメチル基]を含有するDNA若しくはRNAオリゴヌクレオチド類縁体(II)は下記のような優れた特性を有することが確認された。すなわち、

(1) 相補なRNA鎖に対する二重鎖形成能が非常に高い。

[0009] DNAオリゴヌクレオチド中に2',4'-BNA^{NC}ユニットを1個導入する毎に(1修飾当たり) T_m値が3〜6℃上昇する。しかも、相補なDNA鎖に対する二重鎖形成能の上昇(向上)はほとんどない。この特性は、相補なRNA鎖に対する結合親和性においては2',4'-BNA修飾DNAオリゴヌクレオチド同様、飛躍的なT_m値の上昇(二重鎖形成能の格段の向上)がある一方で、相補なDNA鎖に対する二重鎖形成能においては2',4'-BNA修飾DNAオリゴヌクレオチドでは未修飾DNAオリゴヌクレオチドと比べて向上が観察される(1修飾当たりT_m値が2〜4℃上昇)のとは対照的に、2',4'-BNA^{NC}修飾DNAオリゴヌクレオチドでは殆ど結合親和性の向上は認められない。従って、本2',4'-BNA^{NC}修飾DNAオリゴヌクレオチドはRNA鎖への選択的結合親和性に極めて優れている。

(2) また、2',4'-BNA^{NC}修飾DNAオリゴヌクレオチドは二本鎖DNA鎖に対する三重鎖形成能にも卓越している。

[0010] DNAオリゴヌクレオチド中に2',4'-BNA^{NC}ユニットを1個導入すると二本鎖DNA鎖に対する三重鎖形成においてT_m値が7〜12℃上昇する。また、三重鎖形成には塩基配列を厳密に識別し、ターゲット配列にのみ結合するという配列選択性が必要とされるが、2',4'-BNA^{NC}修飾DNAオリゴヌクレオチドのマッチ配列とミスマッチ配列とに対するT_m値の差は25℃以上あり、天然型DNAオリゴヌクレオチドを上回る優れた配列選択性を有している。

(3) ヌクレアーゼ耐性が抜群である。

[0011] 2',4'-BNA^{NC}修飾オリゴヌクレオチドは天然DNAオリゴヌクレオチドよりもヌクレアーゼ耐性が高いが、S-オリゴ(ホスホロチオアート型オリゴヌクレオチド)よりはるかに低い。本発明の2',4'-BNA^{NC}修飾オリゴヌクレオチドは2',4'-BNA修飾オリゴヌクレオチドはもとより、ヌクレアーゼ耐性の優れていることで高く評価されているS-オリゴよりもヌクレアーゼ耐性に優れており、生体内での分解が強く抵抗する特性を有している。

(4) 本発明の人工核酸2',4'-BNA^{NC}分子中に含まれるN-O結合は還元試薬により緩やかな条件下で選択的に開裂することができ、NH基とOH基が遊離する。このNH基やOH基を足掛かりに別機能性分子を結合させることで、オリゴヌクレオチド類縁体調

製の前後を問わず、様々な複合体(コンジュゲート体)を得ることが容易である。別機能性分子としては、蛍光分子や化学発光分子や放射性同位原子を含む分子種などの標識用分子、様々なDNA(RNA)切断活性分子、細胞内や核内移行シグナルペプチド類等々、が可能である。

- [0012] 以上、本発明の2',4'-BNA^{NC}を様々な形態で修飾したDNAやRNAオリゴヌクレオチド類縁体は、アンチセンス法、アンチジーン法、デコイ法、遺伝子相同組み換え法、RNA干渉法などによる遺伝子医薬品創製の高機能性素材としてのみならず、モレキュラービーコンやDNAチップなどの遺伝子診断法の基材として、また、遺伝子機能解析解明等の研究用試薬の開発素材として、極めて有用性の高いものである。

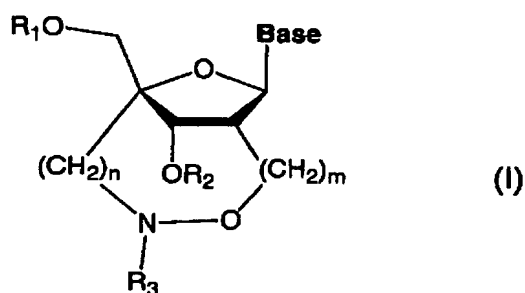
図面の簡単な説明

- [0013] [図1]本発明のオリゴヌクレオチド類縁体(8)と、天然型及び非天然型のオリゴヌクレオチド類縁体をエキソヌクレアーゼで分解した時の経時変化を、HPLC定量による未分解オリゴヌクレオチドの残存率として示すグラフである。

発明の実施の形態

- [0014] 本発明のヌクレオシド類縁体は、下記一般式(I)で表される化合物及びその塩。

- [0015] [化1]



- [0016] (式中、Baseは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基もしくは芳香族炭化水素環基を示す。
- [0017] R_1 、 R_2 は、同一又は異なって、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、または、-P(

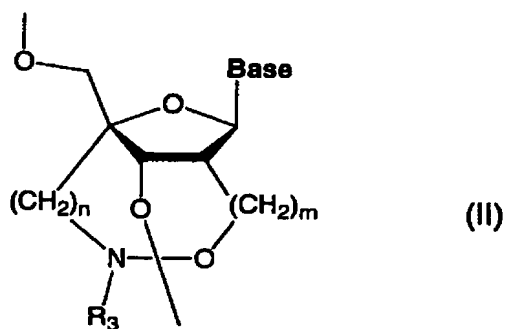
$R_4)R_5$ [式中、 R_4 及び R_5 は、同一または異なって、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1〜5のアルコキシ基、炭素数1〜5のアルキルチオ基、炭素数1〜6のシアノアルコキシ基、または、炭素数1〜5のアルキル基で置換されたアミノ基を示す。]を示す。

[0018] R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラールキル基、アシル基、スルホニル基、及び機能性分子ユニット置換基を示す。

[0019] m は、0〜2の整数、及び n は、1〜3の整数である。)

本発明のオリゴヌクレオチド類縁体は、下記一般式(II)で表されるヌクレオシド類縁体の単位構造のいずれか1種以上を1または2個以上含有するDNAオリゴヌクレオチド又はRNAオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩である。但し、これら構造の1種以上を2個以上含有する場合は、当該構造間でBaseは同一または異なっても良い。また、オリゴヌクレオチド類縁体中の各ヌクレオシド間の結合は、天然核酸と同じリン酸ジエステル結合 $[-OP(O_2^-)O-]$ 以外にホスホロチオアート結合 $[-OP(O)(S^-)O-]$ を1又は2個以上含有していても良い。

[0020] [化2]



[0021] (式中、Base、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 m 、 n は、前に定義した通りである。)

一般式(I)及び(II)中、Baseの芳香族複素環基とは、炭化水素環の構成原子である炭素原子を、1個以上の窒素原子、硫黄原子もしくは酸素原子などのヘテロ原子に置き換えた構造を有し、芳香族性を示す5〜20員環のあらゆる基をいい、単環、縮合環を含む。具体的には、例えば、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基、以下の α 群から選択される置換基を1つ以上有していてもよいピリミジンもしくはプリン核酸塩基

が挙げられる。ここで、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基には、核酸の構成成分として一般に知られる塩基(例えば、グアニン、アデニン、シトシン、チミン、ウラシル)、及びその他これらに類する核酸成分の塩基として作用もしくは代用し得るあらゆる化学構造が含まれる。その他、チオフェン、チアントレン、フラン、ピラン、イソベンゾフラン、クロメン、キサントエン、フェノキサチン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、イソチアゾール、イソキサゾール、ピリダジン、インドリジン、インドール、イソインドール、イソキノリン、キノリン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、プテリジン、カルバゾール、フェナントリジン、アクリジン、ペリミジン、フェナジン、フェナルサジン、フェノチアジン、フラザン、フェノキサジン、ピロリジン、ピロリン、イミダゾリジン、イミダゾリン、ピラゾリジンなども含まれる。好適には、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基、以下の α 群から選択される置換基を1つ以上有していてもよいピリミジンもしくはプリン核酸塩基であり、具体的には、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、または下記 α 群から選択される置換基を有するプリン-9-イル基もしくは2-オキソ-ピリミジン-1-イル基が好適である。

- [0022] α 群: 水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1-5のアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1-5のアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、炭素数1-5のアルキル基で置換されたアミノ基、炭素数1-5のアルキル基、および、ハロゲン原子。ここで、「置換基を有していてもよいプリン核酸塩基」として好適な基は、6-アミノプリン-9-イル(即ち、アデニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル(即ち、グアニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-

イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル又は6-メルカプトプリン-9-イル基であり、さらに好適には、6-ベンゾイルアミノプリン-9-イル、アデニル、2-イソブチルアミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル又はグアニル基である。

[0023] また、「置換基を有していてもよいピリミジン核酸塩基」として好適な基は、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、シトシニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、ウラシニル)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、チミニル)または4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、5-メチルシトシニル)基であり、さらに好適には、2-オキソ-4-ベンゾイルアミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、シトシニル、チミニル、ウラシニル、2-オキソ-4-ベンゾイルアミノ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、又は5-メチルシトシニル基である。

[0024] 「置換基を有していてもよいプリンもしくはピリミジン核酸塩基」の中で、さらに好適には、6-アミノプリン-9-イル(即ち、アデニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル(即ち、グアニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イ

ル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、シトシニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、ウラシニル)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、チミニル)、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、5-メチルシトシニル)、または、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである。

[0025] 一般式(I)及び(II)中、Baseの芳香族炭化水素環基とは、炭素数6〜20の芳香族性を示す炭化水素環から水素原子1個を除いた1価の置換基を意味し、単環、縮合環を含む。具体的には、例えば、フェニル、インデニル、ナフチル、ペンタレニル、アズレニル、ヘプタレニル、ビフェニレニル、インダセニル、フルオレニル、フェナントリル、アントリルなどが挙げられるが、その他本発明の目的において核酸成分の塩基部分として代用可能なあらゆる構造が含まれる。また、芳香族炭化水素環が、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、アミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、ハロゲン原子、低級アルキル基、アルコキシ基、カルボキシ基、アリーロキシ基、ニトロ基、トリフルオロメチル、フェニル基等の1種以上の基によって置換されていてもよく、そのような置換されていてもよい芳香族炭化水素基としては、例えば、4-ヒドロキシフェニル、2-ヒドロキシフェニル、4-アミノフェニル、2-アミノフェニル、2-メチルフェニル、2, 6-ジメチルフェニル、2-クロロフェニル、4-クロロフェニル、2, 4-ジクロロフェニル、2, 5-ジクロロフェニル、2-ブロモフェニル、4-メトキシフェニル、4-クロロ-2-ニトロフェニル、4-ニトロフェニル、2, 4-ジニトロフェニル、ビフェニルなどが挙げられる。置換されていてもよい芳香族炭化水素環基としては、好適には、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、アミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、低級アルコキシ基もしくはニトロ基で置換されたフェニル

基、フェニル基などが挙げられる。

- [0026] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 の「核酸合成の水酸基の保護基」、 R_4 、 R_5 、及び α 群の「核酸合成の保護基で保護された水酸基」の保護基とは、核酸合成の際に安定して水酸基を保護し得るものであれば、特に制限はないが、具体的には、酸性又は中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解及び光分解のような化学的方法により開裂し得る保護基のことをいい、そのような保護基としては、例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ペンタノイル、ピバロイル、バレリル、イソバレリル、オクタノイル、ノナノイル、デカノイル、3-メチルノナノイル、8-メチルノナノイル、3-エチルオクタノイル、3, 7-ジメチルオクタノイル、ウンデカノイル、ドデカノイル、トリデカノイル、テトラデカノイル、ペンタデカノイル、ヘキサデカノイル、1-メチルペンタデカノイル、14-メチルペンタデカノイル、13, 13-ジメチルテトラデカノイル、ヘプタデカノイル、15-メチルヘキサデカノイル、オクタデカノイル、1-メチルヘプタデカノイル、ノナデカノイル、アイコサノイル及びヘナイクサノイルのようなアルキルカルボニル基、スクシノイル、グルタロイル、アジポイルのようなカルボキシ化アルキルカルボニル基、クロロアセチル、ジクロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチルのようなハロゲノ低級アルキルカルボニル基、メトキシアセチルのような低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基、(E)-2-メチル-2-ブテノイルのような不飽和アルキルカルボニル基のような「脂肪族アシル基」；メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、s-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、n-ヘキシル、イソヘキシル、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、3, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチルのような「低級アルキル基」；エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、1-メチル-1-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、2-エチル-2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、1-メチル-2-ブテニル、1-メチル-1-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-エチル-2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-3-ブテニル、2-メチル-3-ブテニル、1-エチル-3-ブテニル

、1-ペンテニル、2-ペンテニル、1-メチル-2-ペンテニル、2-メチル-2-ペンテニル、3-ペンテニル、1-メチル-3-ペンテニル、2-メチル-3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-4-ペンテニル、2-メチル-4-ペンテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニルのような「低級アルケニル基」；ベンゾイル、 α -ナフトイル、 β -ナフトイルのようなアリールカルボニル基、2-ブロモベンゾイル、4-クロロベンゾイルのようなハロゲンアリールカルボニル基、2, 4, 6-トリメチルベンゾイル、4-トルオイルのような低級アルキル化アリールカルボニル基、4-アニソイルのような低級アルコキシ化アリールカルボニル基、2-カルボキシベンゾイル、3-カルボキシベンゾイル、4-カルボキシベンゾイルのようなカルボキシ化アリールカルボニル基、4-ニトロベンゾイル、2-ニトロベンゾイルのようなニトロ化アリールカルボニル基；2-(メトキシカルボニル)ベンゾイルのような低級アルコキシカルボニル化アリールカルボニル基、4-フェニルベンゾイルのようなアリール化アリールカルボニル基のような「芳香族アシル基」；テトラヒドロピラン-2-イル、3-ブロモテトラヒドロピラン-2-イル、4-メトキシテトラヒドロピラン-4-イル、テトラヒドロチオピラン-4-イル、4-メトキシテトラヒドロチオピラン-4-イルの「テトラヒドロピラニル又はテトラヒドロチオピラニル基」；テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロチオフラン-2-イルのような「テトラヒドロフラニル又はテトラヒドロチオフラニル基」；トリメチルシリル、トリエチルシリル、イソプロピルジメチルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル、メチルジイソプロピルシリル、メチルジ-*t*-ブチルシリル、トリイソプロピルシリルのようなトリ低級アルキルシリル基、ジフェニルメチルシリル、ジフェニルブチルシリル、ジフェニルイソプロピルシリル、フェニルジイソプロピルシリルのような1-2個のアリール基で置換されたトリ低級アルキルシリル基のような「シリル基」；メトキシメチル、1, 1-ジメチル-1-メトキシメチル、エトキシメチル、プロポキシメチル、イソプロポキシメチル、ブトキシメチル、*t*-ブトキシメチルのような「低級アルコキシメチル基」；2-メトキシエトキシメチルのような「低級アルコキシ化低級アルコキシメチル基」；2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル、ビス(2-クロロエトキシ)メチルのような「ハロゲン低級アルコキシメチル基」；1-エトキシエチル、1-(イソプロポキシ)エチルのような「低級アルコキシ化エチル基」；2, 2, 2-トリクロロエチルのような「ハロゲン化エチル基」；ベンジル、 α -ナフチルメチル、 β -ナフチルメチル

ル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、 α -ナフチルジフェニルメチル、9-アンズ
 リルメチルのような「1-3個のアリール基で置換されたメチル基」；4-メチルベンジル
 、2, 4, 6-トリメチルベンジル、3, 4, 5-トリメチルベンジル、4-メトキシベンジル、4-
 メトキシフェニルジフェニルメチル、4, 4'-ジメトキシトリフェニルメチル、2-ニトロベン
 ジル、4-ニトロベンジル、4-クロロベンジル、4-ブロモベンジル、4-シアノベンジル
 のような「低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、シアノ基でアリール環が置換さ
 れた1-3個のアリール基で置換されたメチル基」；メトキシカルボニル、エトキシカル
 ボニル、*t*-ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニルのような「低級アルコキシカル
 ボニル基」；4-クロロフェニル、2-フロロフェニル、4-メトキシフェニル、4-ニトロフェ
 ニル、2, 4-ジニトロフェニルのような「ハロゲン原子、低級アルコキシ基又はニトロ基
 で置換されたアリール基」；2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル、2-トリメチルシリル
 エトキシカルボニルのような「ハロゲン又はトリ低級アルキルシリル基で置換された低
 級アルコキシカルボニル基」；ビニルオキシカルボニル、アリールオキシカルボニルの
 ような「アルケニルオキシカルボニル基」；ベンジルオキシカルボニル、4-メトキシベン
 ジルオキシカルボニル、3, 4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、2-ニトロベンジ
 ルオキシカルボニル、4-ニトロベンジルオキシカルボニルのような1-2個の「低級ア
 ルコキシ又はニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラルキルオキシカルボ
 ニル基」を挙げることができる。

- [0027] R_1 および R_2 の「核酸合成の水酸基の保護基」においては、好適には、「脂肪族アシル
 基」、「芳香族アシル基」、「1-3個のアリール基で置換されたメチル基」、「低級ア
 ルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、シアノ基でアリール環が置換された1-3個のア
 リール基で置換されたメチル基」又は「シリル基」であり、さらに好適には、アセチル基
 、ベンゾイル基、ベンジル基、*p*-メトキシベンゾイル基、ジメトキシトリチル基、モノメ
 トキシトリチル基又は *tert*-ブチルジフェニルシリル基であり、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 又は α 群
 の「核酸合成の保護基で保護された水酸基」の保護基においては、好適には、「脂肪
 族アシル基」、「芳香族アシル基」、「1-3個のアリール基で置換されたメチル基」、「
 ハロゲン原子、低級アルコキシ基又はニトロ基で置換されたアリール基」、「低級アル
 キル基」又は「低級アルケニル基」であり、さらに好適には、ベンゾイル基、ベンジル

基、2-クロロフェニル基、4-クロロフェニル基又は2-プロペニル基である。

- [0028] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 および R_3 の「アルキル基」とは、炭素数1〜20の直鎖または分岐鎖状のアルキル基を示し、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*s*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、*n*-ヘキシル、イソヘキシル、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、3, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチルのような炭素数1〜6の直鎖または分岐鎖状のアルキル基(本明細書においては、これらを低級アルキル基とも称す。)の他、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなど炭素数7〜20の直鎖または分岐鎖状のアルキル基が含まれ、好適には、上記の炭素数1〜6の直鎖または分岐鎖状のアルキル基である。

- [0029] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 および R_3 の「アルケニル基」とは、炭素数2〜20の直鎖または分岐鎖状のアルケニル基を示し、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、1-メチル-1-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、2-エチル-2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、1-メチル-2-ブテニル、1-メチル-1-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-エチル-2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-3-ブテニル、2-メチル-3-ブテニル、1-エチル-3-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、1-メチル-2-ペンテニル、2-メチル-2-ペンテニル、3-ペンテニル、1-メチル-3-ペンテニル、2-メチル-3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-4-ペンテニル、2-メチル-4-ペンテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニルのような炭素数2〜6の直鎖または分岐鎖状のアルケニル基(本明細書においては、これらを低級アルケニル基とも称す。)の他、ゲラニル、ファルネシルなどが含まれ、好適には、上記の炭素数2〜6の直鎖または分岐鎖状のアルケニル基である。

- [0030] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 および R_3 の「シクロアルキル基」とは、炭素数3〜10のシクロアルキル基を示し、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、ノルボルニル、アダマンチルなどが挙げ

られ、好適には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチルなどの炭素数3〜8のシクロアルキル基である。また、「シクロアルキル基」には、上記シクロアルキル基の環上の1つ以上のメチレンが酸素原子や硫黄原子、あるいはアルキル基で置換された窒素原子に置換された複素環基も含まれ、例えば、テトラヒドロピラニル基などが挙げられる。

[0031] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 および R_3 の「アリール基」とは、芳香族炭化水素基から水素原子1個を除いた炭素数6〜14の1価の置換基を意味し、例えば、フェニル、インデニル、ナフチル、フェナンスレニル、アントラセニルなどが挙げられる。また、アリール環が、ハロゲン原子、低級アルキル基、水酸基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アミノ基、ニトロ基、トリフルオロメチル、フェニル基等の1種以上の基によって置換されていてもよく、そのような置換されていてもよいアリール基としては、例えば、2-メチルフェニル、2, 6-ジメチルフェニル、2-クロロフェニル、4-クロロフェニル、2, 4-ジクロロフェニル、2, 5-ジクロロフェニル、2-ブロモフェニル、4-メトキシフェニル、4-クロロ-2-ニトロフェニル、4-ニトロフェニル、2, 4-ジニトロフェニル、ビフェニルなどが挙げられる。好適には、ハロゲン原子、低級アルコキシ基ニトロ基で置換されたフェニル基、フェニル基などが挙げられる。

[0032] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 および R_3 の「アラルキル基」とは、アリール基で置換された炭素数1〜6のアルキル基を意味し、ベンジル、 α -ナフチルメチル、 β -ナフチルメチル、インデニルメチル、フェナンスレニルメチル、アントラセニルメチル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、 α -ナフチルジフェニルメチル、9-アンスリルメチルのような「1〜3個のアリール基で置換されたメチル基」や、4-メチルベンジル、2, 4, 6-トリメチルベンジル、3, 4, 5-トリメチルベンジル、4-メトキシベンジル、4-メトキシフェニルジフェニルメチル、4, 4'-ジメトキシトリフェニルメチル、2-ニトロベンジル、4-ニトロベンジル、4-クロロベンジル、4-ブロモベンジル、4-シアノベンジルのような「低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、シアノ基でアリール環が置換された1〜3個のアリール基で置換されたメチル基」の他、1-フェネチル、2-フェネチル、1-ナフチルエチル、2-ナフチルエチル、1-フェニルプロピル、2-フェニルプロピル、3-フェニルプロピル、1-ナフチルプロピル、2-ナフチルプロピル、3-ナフチルプ

ロピル、1-フェニルブチル、2-フェニルブチル、3-フェニルブチル、4-フェニルブチル、1-ナフチルブチル、2-ナフチルブチル、3-ナフチルブチル、4-ナフチルブチル、1-フェニルペンチル、2-フェニルペンチル、3-フェニルペンチル、4-フェニルペンチル、5-フェニルペンチル、1-ナフチルペンチル、2-ナフチルペンチル、3-ナフチルペンチル、4-ナフチルペンチル、5-ナフチルペンチル、1-フェニルヘキシル、2-フェニルヘキシル、3-フェニルヘキシル、4-フェニルヘキシル、5-フェニルヘキシル、6-フェニルヘキシル、1-ナフチルペンチル、2-ナフチルペンチル、3-ナフチルペンチル、4-ナフチルペンチル、5-ナフチルペンチル、6-ナフチルペンチル、などの「アリール基で置換された炭素数3〜6のアルキル基」などが含まれる。好適には、「1〜3個のアリール基で置換されたメチル基」、「低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、シアノ基でアリール環が置換された1〜3個のアリール基で置換されたメチル基」であり、さらに好適には、4-メトキシフェニルジフェニルメチル、4, 4'-ジメトキシトリフェニルメチルである。

- [0033] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 および R_3 の「アシル基」としては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ペンタノイル、ピバロイル、バレリル、イソバレリル、オクタノイル、ノナノイル、デカノイル、3-メチルノナノイル、8-メチルノナノイル、3-エチルオクタノイル、3, 7-ジメチルオクタノイル、ウンデカノイル、ドデカノイル、トリデカノイル、テトラデカノイル、ペンタデカノイル、ヘキサデカノイル、1-メチルペンタデカノイル、14-メチルペンタデカノイル、13, 13-ジメチルテトラデカノイル、ヘプタデカノイル、15-メチルヘキサデカノイル、オクタデカノイル、1-メチルヘプタデカノイル、ノナデカノイル、アイコサノイル及びヘナイコサノイルのようなアルキルカルボニル基、スクシノイル、グルタロイル、アジポイルのようなカルボキシ化アルキルカルボニル基、クロロアセチル、ジクロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチルのようなハロゲン低級アルキルカルボニル基、メトキシアセチルのような低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基、フェノキシアセチル基のようなアリールオキシ低級アルキルカルボニル基、(E)-2-メチル-2-ブテノイルのような不飽和アルキルカルボニル基のような「脂肪族アシル基」、およびベンゾイル、 α -ナフトイル、 β -ナフトイルのようなアリールカルボニル基、2-プロモベンゾイル、4-クロロベンゾイルのような

ハロゲノアリールカルボニル基、2, 4, 6-トリメチルベンゾイル、4-トルオイルのような低級アルキル化アリールカルボニル基、4-アニソイルのような低級アルコキシ化アリールカルボニル基、2-カルボキシベンゾイル、3-カルボキシベンゾイル、4-カルボキシベンゾイルのようなカルボキシ化アリールカルボニル基、4-ニトロベンゾイル、2-ニトロベンゾイルのようなニトロ化アリールカルボニル基; 2-(メトキシカルボニル)ベンゾイルのような低級アルコキシカルボニル化アリールカルボニル基、4-フェニルベンゾイルのようなアリール化アリールカルボニル基のような「芳香族アシル基」が挙げられ、好適には、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ペンタノイル、ピバロイル、ベンゾイル、フェノキシアセチル基である。

[0034] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 および R_3 の「スルホニル基」としては、メタンスルホニル、エタンスルホニルのように炭素数が1〜6の直鎖あるいは分岐アルキル基が置換したスルホニル基のような「脂肪族スルホニル基」、ベンゼンスルホニル、p-トルエンスルホニルのような各種アリール基が置換したスルホニル基のような「芳香族スルホニル基」が挙げられ、好適にはメタンスルホニル、p-トルエンスルホニル基である。

[0035] 一般式(I)または(II)中、 R_1 、 R_2 および R_3 の「シリル基」としては、トリメチルシリル、トリエチルシリル、イソプロピルジメチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、メチルジイソプロピルシリル、メチルジ-t-ブチルシリル、トリイソプロピルシリルのような「トリ低級アルキルシリル基」、ジフェニルメチルシリル、ブチルジフェニルブチルシリル、ジフェニルイソプロピルシリル、フェニルジイソプロピルシリルのような「1〜2個のアリール基で置換されたトリ低級アルキルシリル基」などが挙げられ、好適には、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリルであり、さらに好適にはトリメチルシリルである。

[0036] 一般式(I)または(II)中、 R_1 および R_2 の「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」の「保護基」とは、核酸合成の際に安定してリン酸基を保護し得るものであれば、特に限定はないが、具体的には、酸性又は中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解及び光分解のような化学的方法により開裂し得る保護基のことをいい、そのような保護基としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、s-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、2-メチ

ルブチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、n-ヘキシル、イソヘキシル、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、3, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチルのような「低級アルキル基」; 2-シアノエチル、2-シアノ-1, 1-ジメチルエチルのような「シアノ化低級アルキル基」; 2-メチルジフェニルシリルエチル、2-トリメチルシリルエチル、2-トリフェニルシリルエチルのような「シリル基で置換されたエチル基」; 2, 2, 2-トリクロロエチル、2, 2, 2-トリブromoエチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、2, 2, 2-トリクロロ-1, 1-ジメチルエチルのような「ハロゲン化低級アルキル基」; エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、1-メチル-1-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、2-エチル-2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、1-メチル-2-ブテニル、1-メチル-1-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-エチル-2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-3-ブテニル、2-メチル-3-ブテニル、1-エチル-3-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、1-メチル-2-ペンテニル、2-メチル-2-ペンテニル、3-ペンテニル、1-メチル-3-ペンテニル、2-メチル-3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-4-ペンテニル、2-メチル-4-ペンテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニルのような「低級アルケニル基」; シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、ノルボルニル、アダマンチルのような「シクロアルキル基」; 2-シアノブテニルのような「シアノ化低級アルケニル基」; ベンジル、 α -ナフチルメチル、 β -ナフチルメチル、インデニルメチル、フェナンスレニルメチル、アントラセニルメチル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、1-フェネチル、2-フェネチル、1-ナフチルエチル、2-ナフチルエチル、1-フェニルプロピル、2-フェニルプロピル、3-フェニルプロピル、1-ナフチルプロピル、2-ナフチルプロピル、3-ナフチルプロピル、1-フェニルブチル、2-フェニルブチル、3-フェニルブチル、4-フェニルブチル、1-ナフチルブチル、2-ナフチルブチル、3-ナフチルブチル、4-ナフチルブチル、1-フェニルペンチル、2-フェニルペンチル、3-フェニルペンチル、4-フェニルペンチル、5-フェニルペンチル、1-ナフチルペンチル、2-ナフチルペンチル、3-ナフチルペンチル、4-ナフチルペン

チル、5-ナフチルペンチル、1-フェニルヘキシル、2-フェニルヘキシル、3-フェニルヘキシル、4-フェニルヘキシル、5-フェニルヘキシル、6-フェニルヘキシル、1-ナフチルペンチル、2-ナフチルペンチル、3-ナフチルペンチル、4-ナフチルペンチル、5-ナフチルペンチル、6-ナフチルペンチルのような「アラルキル基」；4-クロロベンジル、2-(4-ニトロフェニル)エチル、o-ニトロベンジル、4-ニトロベンジル、2,4-ジニトロベンジル、4-クロロ-2-ニトロベンジルのような「ニトロ基、ハロゲン原子でアリアル環が置換されたアラルキル基」；フェニル、インデニル、ナフチル、フェナンスレニル、アントラセニルのような「アリアル基」；2-メチルフェニル、2,6-ジメチルフェニル、2-クロロフェニル、4-クロロフェニル、2,4-ジクロロフェニル、2,5-ジクロロフェニル、2-ブロモフェニル、4-ニトロフェニル、4-クロロ-2-ニトロフェニルのような「低級アルキル基、ハロゲン原子、ニトロ基で置換されたアリアル基」を挙げることができ、好適には「低級アルキル基」、「シアノ基で置換された低級アルキル基」、「アラルキル基」、「ニトロ基、ハロゲン原子でアリアル環が置換されたアラルキル基」または「低級アルキル基、ハロゲン原子、ニトロ基で置換されたアリアル基」であり、さらに好適には、2-シアノエチル基、2,2,2-トリクロロエチル基、ベンジル基、2-クロロフェニル基または4-クロロフェニル基である。

[0037] 一般式(I)または(II)中、 R_3 の「機能性分子ユニット置換基」とは、標識分子(例えば、蛍光分子、化学発光分子、放射性同位原子を含む分子種等)、DNAやRNA切断活性分子、細胞内や核内移行シグナルペプチド等を含む。

[0038] 一般式(I)または(II)中、 R_4 及び R_5 並びに α 群の「核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基」の保護基としては、核酸合成の際に安定してメルカプト基を保護し得るものであれば、特に限定はないが、具体的には、酸性又は中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解及び光分解のような化学的方法により開裂し得る保護基をいい、例えば、上記水酸基の保護基として挙げたものの他、メチルチオ、エチルチオ、tert-ブチルチオのようなアルキルチオ基、ベンジルチオのようなアリアルチオ基等の「ジスルフィドを形成する基」を挙げることができ、好適には、「脂肪族アシル基」又は「芳香族アシル基」であり、さらに好適には、ベンゾイル基、ベンジル基である。

- [0039] 一般式(I)または(II)中、 R_4 、 R_5 、及び α 群の「炭素数1〜5のアルコキシ基」としては、例えば、メキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、イソブトキシ、*s*-ブトキシ、*tert*-ブトキシ、*n*-ペントキシを挙げることができ、好適には、メキシ又はエトキシ基である。
- [0040] 一般式(I)または(II)中、 R_4 、 R_5 、及び α 群の「炭素数1〜5のアルキルチオ基」としては、例えば、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、イソブチルチオ、*s*-ブチルチオ、*tert*-ブチルチオ、*n*-ペンチルチオを挙げることができ、好適には、メチルチオ又はエチルチオ基である。
- [0041] 一般式(I)または(II)中、 R_4 、 R_5 、の「炭素数1〜6のシアノアルコキシ基」とは、上記「炭素数1〜5のアルコキシ基」のシアノ基が置換した基をいい、そのような基としては、例えば、シアノメキシ、2-シアノエトキシ、3-シアノプロポキシ、4-シアノブトキシ、3-シアノ-2-メチルプロポキシ、又は1-シアノメチル-1, 1-ジメチルメキシを挙げることができ、好適には、2-シアノエトキシ基である。
- [0042] 一般式(I)または(II)中、 R_4 、 R_5 、及び α 群の「炭素数1〜5のアルキル基で置換されたアミノ基」としては、例えば、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ブチルアミノ、イソブチルアミノ、*s*-ブチルアミノ、*tert*-ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジイソプロピルアミノ、ジブチルアミノ、ジイソブチルアミノ、ジ(*s*-ブチル)アミノ、ジ(*tert*-ブチル)アミノを挙げることができ、好適には、メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノまたはジイソプロピルアミノ基である。
- [0043] α 群の「炭素数1〜5のアルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、イソブチル、ブチル、イソブチル、*s*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチルなどを挙げることができ、好適には、メチル又はエチル基である。
- [0044] α 群の「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子を挙げることができ、好適には、フッ素原子又は塩素原子である。
- [0045] 「ホスホロアミダイト基」とは、式- $P(OR_{1a})(NR_{1b})$ で表される基(式中、 R_{1a} は炭素数1〜7のアルキル基又は炭素数1〜7のシアノアルキル基を示し、 R_{1b} は炭素数1〜6のアルキル基を示す。)を意味し、好適には、式- $P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ で表され

る基又は式 $-P(OCH_3)_3(N(i-Pr)_2)$ で表される基である。

- [0046] α 群の「核酸合成の保護基で保護されたアミノ基」の保護基としては、核酸合成の際に安定してアミノ基を保護し得るものであれば、特に限定はないが、具体的には、酸性又は中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解及び光分解のような化学的方法により開裂し得る保護基をいい、例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ペンタノイル、ピバロイル、バレリル、イソバレリル、オクタノイル、ノナノイル、デカノイル、3-メチルノナノイル、8-メチルノナノイル、3-エチルオクタノイル、3, 7-ジメチルオクタノイル、ウンデカノイル、ドデカノイル、トリデカノイル、テトラデカノイル、ペンタデカノイル、ヘキサデカノイル、1-メチルペンタデカノイル、14-メチルペンタデカノイル、13, 13-ジメチルテトラデカノイル、ヘプタデカノイル、15-メチルヘキサデカノイル、オクタデカノイル、1-メチルヘプタデカノイル、ノナデカノイル、ノナデカノイル、アイコサノイル及びヘナイコサノイルのようなアルキルカルボニル基、スクシノイル、グルタロイル、アジポイルのようなカルボキシ化アルキルカルボニル基、クロロアセチル、ジクロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチルのようなハロゲン低級アルキルカルボニル基、メトキシアセチルのような低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基、(E)-2-メチル-2-ブテノイルのような不飽和アルキルカルボニル基等の「脂肪族アシル基」；ベンゾイル、 α -ナフトイル、 β -ナフトイルのようなアリールカルボニル基、2-ブロモベンゾイル、4-クロロベンゾイルのようなハロゲンアリールカルボニル基、2, 4, 6-トリメチルベンゾイル、4-トルオイルのような低級アルキル化アリールカルボニル基、4-アニソイルのような低級アルコキシ化アリールカルボニル基、2-カルボキシベンゾイル、3-カルボキシベンゾイル、4-カルボキシベンゾイルのようなカルボキシ化アリールカルボニル基、4-ニトロベンゾイル、2-ニトロベンゾイルのようなニトロ化アリールカルボニル基；2-(メトキシカルボニル)ベンゾイルのような低級アルコキシカルボニル化アリールカルボニル基、4-フェニルベンゾイルのようなアリール化アリールカルボニル基等の「芳香族アシル基」；メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、*t*-ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニルのような「低級アルコキシカルボニル基」；2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル、2-トリメチルシリルエトキシカルボニルのような「ハロゲン又はトリ低級アルキルシリル基

で置換された低級アルコキシカルボニル基」;ビニルオキシカルボニル、アリールオキシカルボニルのような「アルケニルオキシカルボニル基」;ベンジルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-ニトロベンジルオキシカルボニル、4-ニトロベンジルオキシカルボニルのような1-2個の「低級アルコキシ又はニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアルキルオキシカルボニル基」を挙げることができ、好適には、「脂肪族アシル基」又は「芳香族アシル基」であり、さらに好適には、ベンゾイル基である。

- [0047] 「ヌクレオシド類縁体」とは、プリン又はピリミジン塩基と糖が結合した「ヌクレオシド」のうち非天然型のもの、並びに、プリン及びピリミジン以外の芳香族複素環及び芳香族炭化水素環でプリン又はピリミジン塩基との代用が可能なものと糖が結合したもののいう。
- [0048] 「オリゴヌクレオチド類縁体」とは、同一又は異なる「ヌクレオシド」又は「ヌクレオシド類縁体」がリン酸ジエステル結合で2-50個結合した「オリゴヌクレオチド」の非天然型誘導体をいい、そのような類縁体としては、好適には、糖部分が修飾された糖誘導体;リン酸ジエステル部分がチオエート化されたチオアート誘導体;末端のリン酸部分がエステル化されたエステル体;プリン塩基上のアミノ基がアミド化されたアミド体を挙げることができ、さらに好適には、糖部分が修飾された糖誘導体を挙げることができる。
- [0049] 「その塩」とは、本発明の化合物(1)は、塩にすることができるので、その塩をいい、そのような塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩等の金属塩;アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N,N'*-ジベンジリエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩;フッ化水素酸塩、

塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリースルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及び、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

[0050] 「その薬理学上許容される塩」とは、本発明のオリゴヌクレオチド類縁体は塩にすることができるので、その塩をいい、そのような塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩等の金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、 α -オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシナルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジリエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリースルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及び、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

[0051] 本発明の化合物(I)及びその塩のうち、好適な化合物としては、

(1) R_1 が、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族あるいは芳香族スルホニル基、1-3個のアリール基で置換されたメチル基、低級アルキル、低級アル

コキシ、ハロゲンもしくはシアノ基でアリール環が置換された1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、またはシリル基である化合物及びその塩、

(2) R_1 が、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基又はtert-ブチルジフェニルシリル基である化合物及びその塩、

(3) R_2 が、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族あるいは芳香族スルホニル基、1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲンもしくはシアノ基でアリール環が置換された1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基または核酸合成の保護基で保護されたリン酸基である化合物及びその塩、

(4) R_2 が、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、又は、2-クロロフェニルもしくは4-クロロフェニルリン酸基である化合物およびその塩、

(5) R_3 が、水素原子、炭素数1〜5のアルキル基、炭素数1〜5のアルケニル基、炭素数6〜14のアリール基、1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、メタンスルホニル基やp-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族あるいは芳香族スルホニル基又はアセチル基などの炭素数1〜5の脂肪族アシル基やフェノキシアセチル基およびベンゾイル基などの芳香族アシル基である化合物およびその塩、また、 R_3 の機能性分子ユニット置換基が、蛍光あるいは化学発光標識分子、核酸切断活性官能基、又は細胞内若しくは核内移行シグナルペプチドである請求項1〜6のいずれか1項に記載の化合物及びその塩、

(6) Baseが、6-アミノプリン-9-イル(即ち、アデニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-

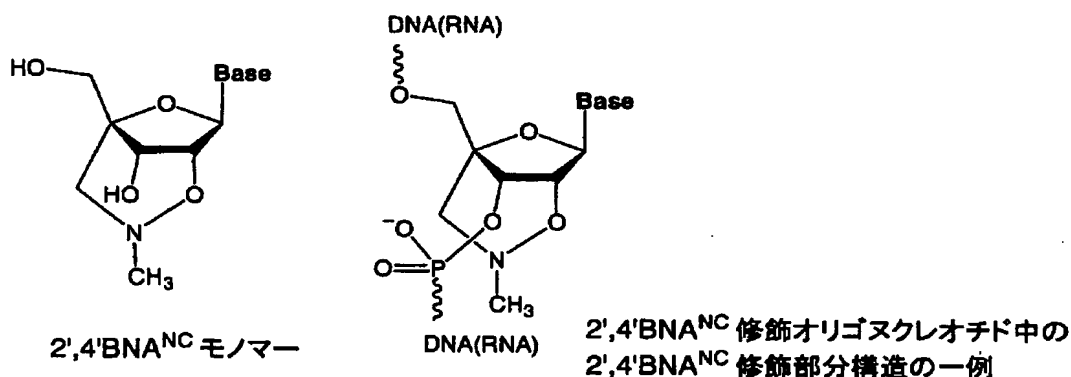
9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル(即ち、グアニニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、シトシニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、ウラシニル)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、チミニル)、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、5-メチルシトシニル)基、または、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである化合物及びその塩、

(7) Baseが、ベンゾイルアミノプリン-9-イル、アデニル、2-イソブチルアミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、グアニニル、2-オキソ-4-ベンゾイルアミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、シトシニル、2-オキソ-5-メチル-4-ベンゾイルアミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、5-メチルシトシニル、ウラシニル又はチミニル基である化合物及びその塩を挙げることができる。

[0052] また、上記(1)〜(2)、(3)〜(4)または(6)〜(7)は、番号が大きくなるに従って、より好適な化合物を示し、一般式(1)において、 R_1 を(1)〜(2)から任意に選択し、 R_2 を(3)〜(4)から任意に選択し、 R_3 を(5)から任意に選択し、Baseを(6)〜(7)から任意に選択し、また、これらを任意に組み合わせて得られた化合物及びその塩も好適であり、特に好適な組合せは、(2)-(3)-(5)-(6)、(2)-(3)-(5)-(7)、(2)-(4)-(5)-(6)及び(2)-(4)-(5)-(7)である。

[0053] 一般式(I)で表される化合物及びその塩で、特に好適には、下記の式で表される化合物及びその塩である。

[0054] [化3]



[0055] 上記群の構造式中、Baseは前述と同じ意味を表す。

[0056] 本発明の一般式(II)で表されるヌクレオシド類縁体の単位構造を1または2個以上含有するオリゴヌクレオチド類縁体及びその薬理学上許容される塩のうち、好適なものとしては、

(8) R₃が、水素原子、炭素数1〜5のアルキル基、ベンジル基などのアラルキル基、アセチル基やベンゾイル基などの低級脂肪族あるいは芳香族アシル基、メタンスルホニル基やp-トルエンスルホニル基などの脂肪族あるいは芳香族スルホニル基であるオリゴヌクレオチド類縁体及びその薬理学上許容される塩、

(9) Baseが、6-アミノプリン-9-イル(即ち、アデニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル(即ち、グアニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプ

リン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、シトシニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、ウラシニル)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、チミニル)、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、5-メチルシトシニル)基、または、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルであるオリゴヌクレオチド類縁体及びその薬理学上許容される塩、

(10) Baseが、ベンゾイルアミノプリン-9-イル、アデニル、2-イソブチルアミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、グアニニル、2-オキソ-4-ベンゾイルアミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、シトシニル、2-オキソ-5-メチル-4-ベンゾイルアミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、5-メチルシトシニル、ウラシニル又はチミニル基であるオリゴヌクレオチド類縁体及びその薬理学上許容される塩を挙げることができる。

[0057] また、(9)〜(10)は、番号が大きくなるに従って、より好適なオリゴヌクレオチド類縁体を示し、R₃を(8)から任意に選択し、Baseを(9)〜(10)から任意に選択し、これらを任意に組合せて得られたオリゴヌクレオチド類縁体及びその薬理学上許容される塩も好適である。一般式(II)における特に好適な組合せは、(8)-(9)、(8)-(10)である。

[0058] 本発明のヌクレオシド類縁体及びオリゴヌクレオチド類縁体は、実施例に記載の方法および本分野の従来技術に基づいて合成できる。

(1)ヌクレオシド類縁体の合成

一般式(I)で表される化合物は、実施例に記載の方法および本分野の従来技術に基づいて合成できる。反応条件、保護基導入試薬、反応試薬は、具体的には実施例に記載の方法を参考にすることができるが、これに限定されず、本分野の技術常識に基づき使用可能な反応条件、試薬を適宜採用することができる。例えば、特開20

00-297097号公報、特開平10-304889号公報に記載の方法を参考にすることができる。また、一般式(I)または(II)におけるBaseとして種々の天然、非天然の核酸塩基およびその他の芳香族複素環や芳香族炭化水素環を有する場合についても、特開平10-304889号公報に記載の方法を参考にして、本発明化合物の原料を合成することができる。

(2) オリゴヌクレオチド類縁体の合成

本発明のヌクレオシド類縁体を含むオリゴヌクレオチド類縁体は、公知のDNAシンセサイザーを用いて種々合成することができる。次いで、得られるオリゴヌクレオチド類縁体を逆相カラムを用いて精製し、生成物の純度を逆相HPLCやMALDI-TOF-MSで分析することにより、精製オリゴヌクレオチド類縁体の生成を確認できる。

本発明のヌクレオシド類縁体は、オリゴヌクレオチド類縁体の中に1個以上存在させることができる。また、オリゴヌクレオチド類縁体の2カ所以上の位置に、1又は2以上の天然ヌクレオチドを介して隔離された状態で存在させてもよい。本発明によれば、本発明のヌクレオシド類縁体を必要な位置に必要な数(長さ)で導入したオリゴヌクレオチド類縁体を合成することができる。オリゴヌクレオチド類縁体全体の長さとしてヌクレオチド単位が2-50、好ましくは8-30個である。

[0059] 本発明のオリゴヌクレオチド類縁体は、ヌクレアーゼに対して分解されにくく、生体への投与後、長く生体内に存在することができる。そして、例えば、センスRNAと二重鎖を形成して病因となる生体内成分(タンパク質)のmRNAへの転写を阻害する。また、感染したウイルスの増殖を阻害すると考えられる。

[0060] これらのことから、本発明のオリゴヌクレオチド類縁体は、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤とはじめとした遺伝子の働きを阻害して疾病を治療する医薬品としての有用性が期待される。即ち、本発明によれば、安定で優れたアンチセンスもしくはアンチジーン活性、又は特定遺伝子の検出薬若しくは増幅開始の為にプライマーとして優れた活性を有する、オリゴヌクレオチド類縁体及びその製造中間体であるヌクレオシド類縁体が提供される。

[0061] 本発明のヌクレオシド類縁体の一つである2',4'-BNA^{NC}モノマーを様々な形態で修

飾したDNAやRNAオリゴヌクレオチド類縁体(オリゴヌクレオチド類縁体)は、各種の生理・生物活性物質類、医薬品類の材料、RNA干渉法やデコイ法用などの二重鎖オリゴヌクレオチドの機能性材料、cDNAなど一本鎖核酸を標的とするDNAチップ、モレキュラービーコン(molecular beacon)などの機能性素材、様々なアンチセンス法(リボザイム、DNAザイムを含む)、アンチジーン法や遺伝子相同組み換え法用途への機能性素材、蛍光や発光物質との組合せによる生体微量成分の高感度分析用材料や遺伝子機能解析解明等の研究用試薬の開発素材として有用である。

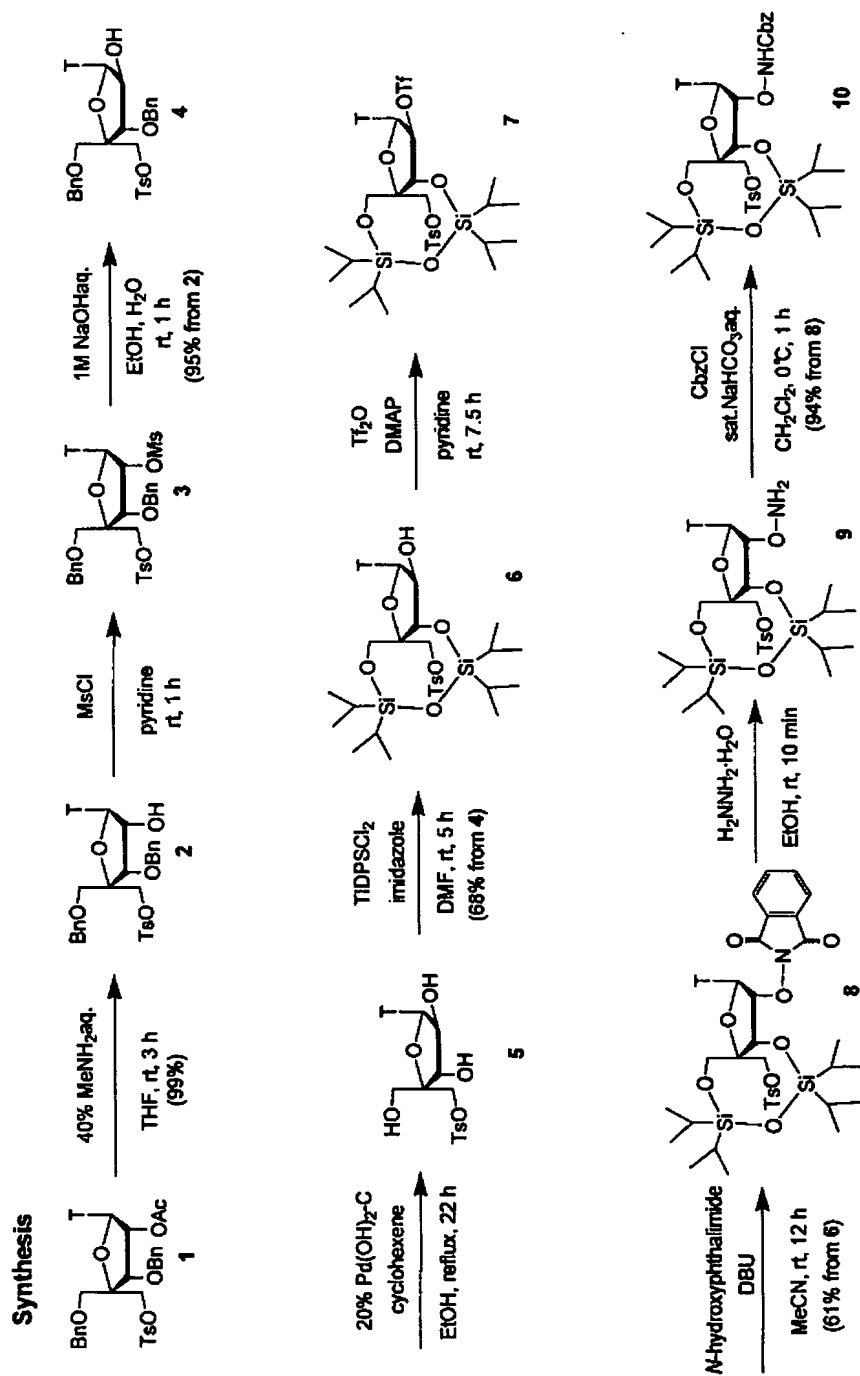
[0062] 本発明のヌクレオシド類縁体やオリゴヌクレオチド類縁体は、例えば緩衝剤および／または安定剤等の慣用の助剤を配合して非経口投与用製剤とすることができる。また、局所用の製剤としては、慣用の医薬用担体を配合して軟膏、クリーム、液剤、または膏薬等に調剤できる。

[0063] 以下、本発明のヌクレオシド類縁体およびオリゴヌクレオチド類縁体を下記の合成スキームに従って合成した。これらの合成は実施例においてさらに詳しく説明する。化合物16、21、17、22はそれぞれ核酸塩基部分がチミンおよびメチルシトシンである $\text{BNA}^{\text{NC}}(\text{NMe})$ および $\text{BNA}^{\text{NC}}(\text{NH})$ をオリゴヌクレオチドに導入するためのアミダイト体であり、また、化合物28からも常法(トリチル化、アミダイト化)に従ってメチルシチジン $\text{BNA}^{\text{NC}}(\text{NH})$ 誘導体導入のためのアミダイト体29が合成可能である。核酸塩基部分がチミンに代わりアデニンおよびグアニンである化合物1の誘導体も既知であることから、本合成経路によりアデノシンおよびグアノシン BNA^{NC} 誘導体も合成可能と考えられる。

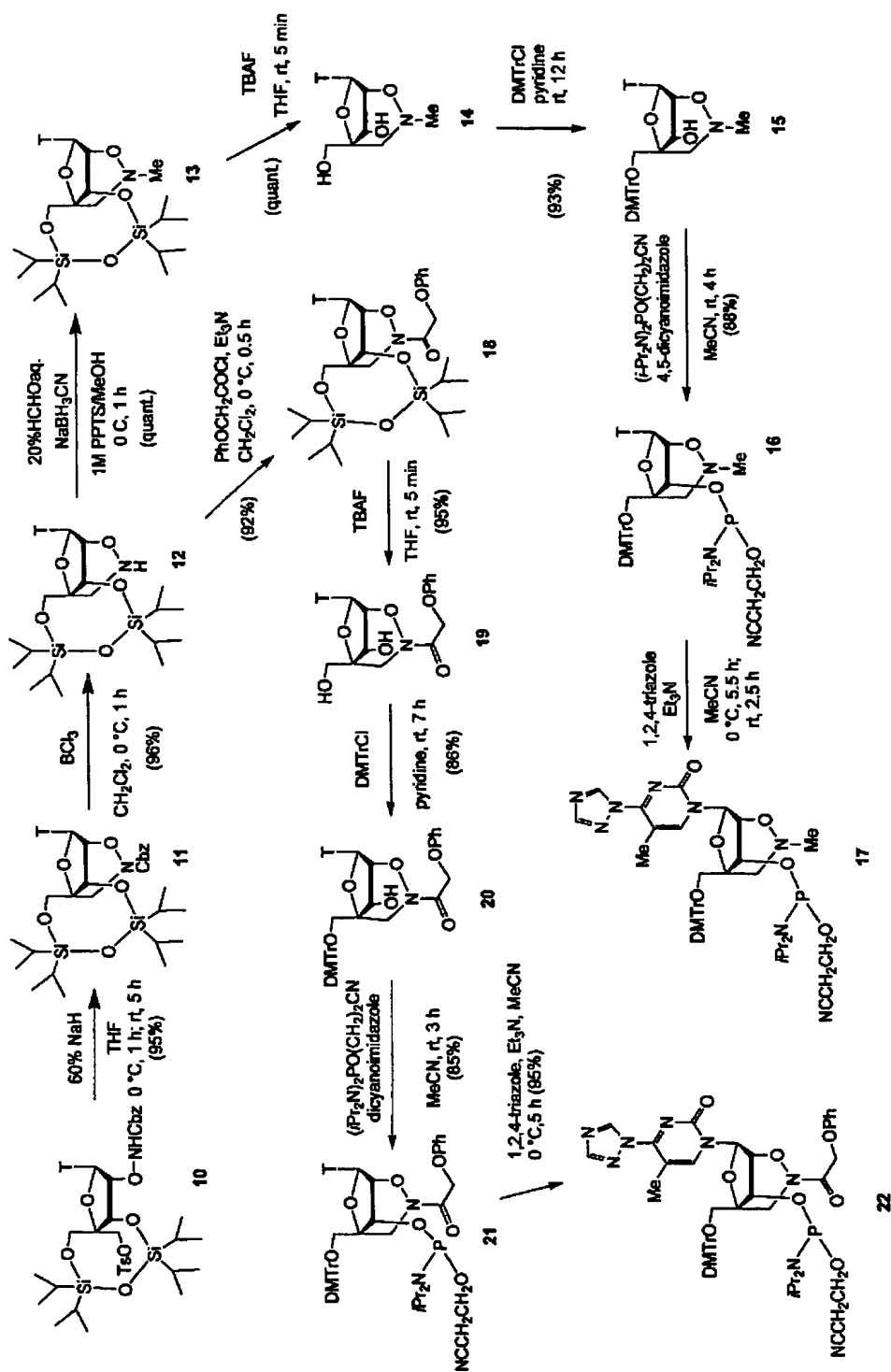
実施例

[0064] 以下、本発明のヌクレオシド類縁体及びオリゴヌクレオチド類縁体を下記の合成スキームに従って、合成した。これらの合成は実施例において更に詳しく説明する。また、合成したオリゴヌクレオチド類縁体の特性を実験例によって測定した。

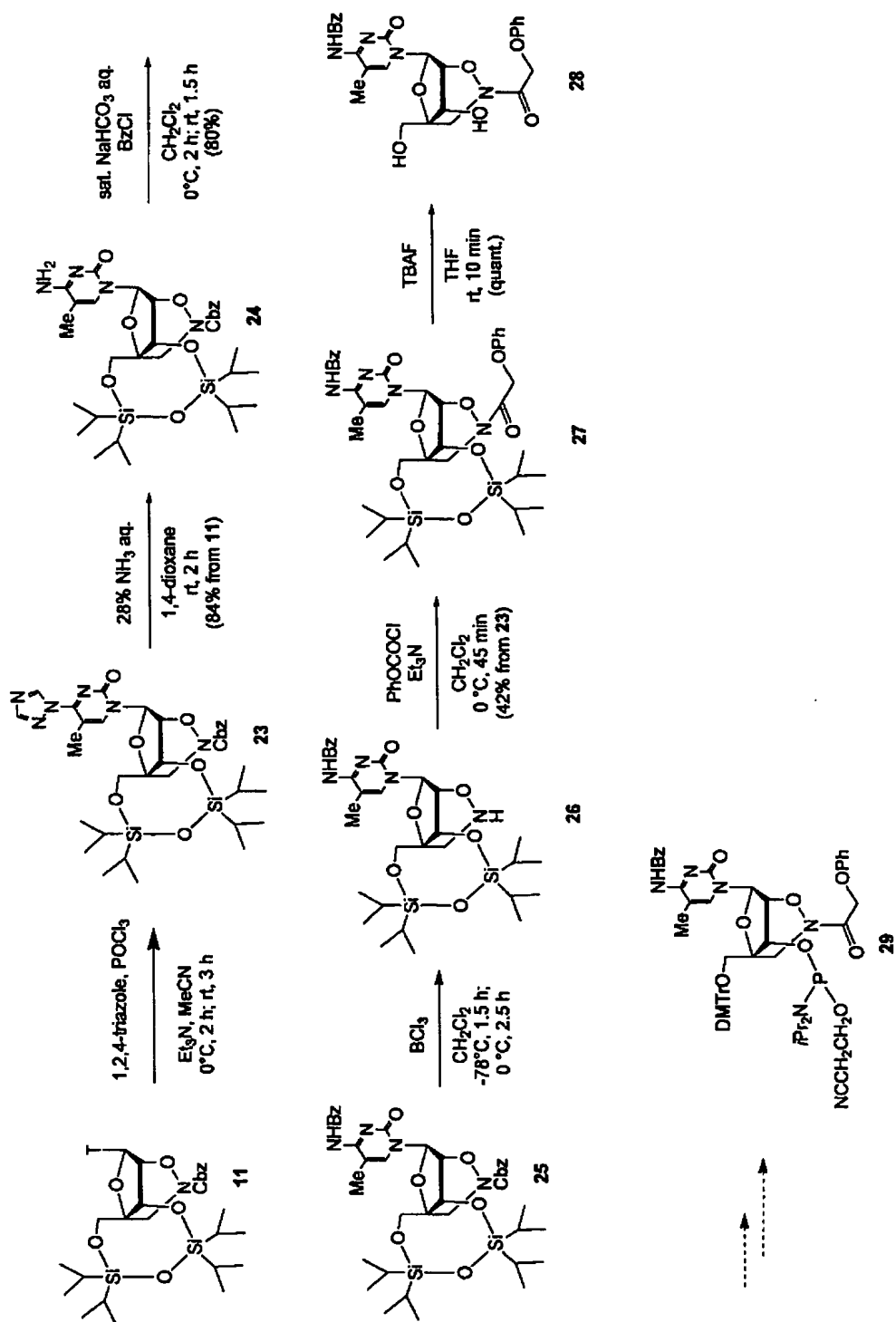
[0065] [化4]



[0066] [145]



[0067] [化6]



[0068] (合成スキームをイメージ入力で取り込む)

[実施例1] ヌクレオシド類縁体(2',4'-BNA^{NC}アミダイト体)の合成

(1) 化合物2の合成

前記の合成スキームに示す化合物1 (49 mg, 0.073 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (3.5 ml) に氷冷下、40%メチルアミン水溶液 (0.11 ml, 1.50 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去した後、酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン:酢酸エチル=1:1) により精製し、化合物2 (45 mg, 99%) を白色固体として得た。

[0069] [数1]

mp 64-66°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.62 (3H, s), 2.43 (3H, s), 3.10 (1H, br), 3.63, 3.71 (2H, AB, J= 10 Hz), 4.18 (2H, s), 4.24 (1H, d, J= 6 Hz), 4.33 (1H, dd, J= 5, 6 Hz), 4.52 (1H, s), 4.60, 4.67 (2H, AB, J= 12 Hz), 5.68 (1H, d, J= 5 Hz), 7.23-7.37 (13H, m), 7.71 (2H, d, J= 8 Hz), 8.52 (1H, br).

[0070] (2) 化合物3の合成

窒素気流下、化合物2 (146 mg, 0.23 mmol) のピリジン溶液 (1.5 ml) に氷冷下、塩化メチルスルホニル (45 l, 0.59 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体3 (170 mg) は精製せず、次の反応に用いた。

[0071] [数2]

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.65 (3H, s), 2.43 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.55, 3.81 (2H, AB, J= 10 Hz), 4.13, 4.22 (2H, AB, J= 11 Hz), 4.41 (1H, d, J= 6 Hz), 4.48 (2H, s), 4.48, 4.78 (2H, AB, J= 12 Hz), 5.32 (1H, dd, J= 4, 6 Hz), 5.91 (1H, d, J= 4Hz), 7.20-7.38 (13H, m), 7.72 (2H, d, J= 6 Hz).

[0072] (3) 化合物4の合成

前反応で得られた粗成績体3 (170 mg) の水-エタノール溶液 (1:2, 6 ml) に、室温で1M水酸化ナトリウム水溶液 (0.70 ml, 0.70 mmol) を加え、1時間攪拌した。10%塩酸水溶液で中和後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラ

ムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール=15:1)により精製し、化合物4(139 mg, 95% from 2 in 2 steps)を白色固体として得た。

[0073] [数3]

mp 73-76°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.65 (3H, s), 2.38 (3H, s), 3.64, 3.70 (2H, AB, *J* = 9 Hz), 4.12 (1H, d, *J* = 2 Hz), 4.15, 4.21 (2H, AB, *J* = 10 Hz), 4.43, 4.64 (2H, AB, *J* = 11 Hz), 4.49 (2H, s), 4.55 (1H, dd, *J* = 2, 4 Hz), 5.97 (1H, d, *J* = 4 Hz), 7.19-7.36 (13H, m), 7.73 (2H, d, *J* = 8 Hz), 9.72 (1H, br).

[0074] (4) 化合物5の合成

窒素気流下、化合物4(0.80 g, 1.28 mmol)のエタノール溶液(10 ml)に、20%水酸化パラジウム-炭素粉末(0.60 g)、シクロヘキセン(5.2 ml, 51 mmol)を加え、5時間加熱還流した。さらに水酸化パラジウム-炭素粉末(0.20 g)を加え、17時間加熱還流した。反応溶液を濾過した後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体5(0.46 g)は、精製せず次の反応に用いた。

[0075] [数4]

mp 103-106°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.85 (3H, d, *J* = 1 Hz), 2.41 (3H, s), 3.67 (2H, s), 4.14, 4.25 (2H, AB, *J* = 11 Hz), 4.16 (1H, dd, *J* = 4, 5 Hz), 4.21 (1H, d, *J* = 4 Hz), 5.87 (1H, d, *J* = 5 Hz), 7.38 (2H, d, *J* = 8 Hz), 7.48 (1H, d, *J* = 1 Hz), 7.79 (2H, d, *J* = 8 Hz).

[0076] (5) 化合物6の合成

窒素気流下、化合物5(0.46 g)のN,N-ジメチルホルムアミド溶液(10 ml)に、1,3-ジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン(0.45 ml, 1.41 mmol)、イミダゾール(0.38 g, 5.63 mmol)を加え、室温にて5時間攪拌した。反応液をエーテルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:酢酸エチル=2:1→1:1)により精製し、化合物6(0.60 g, 68% from 4 in 2 steps)を白色固体として得た。

[0077] [数5]

mp 97-99°C. IR ν_{\max} (KBr): 3185, 3058, 2947, 2869, 1697, 1467, 1366, 1277, 1182, 1036, 1081, 1036 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.82-1.29 (28H, m), 1.86 (3H, s), 2.45 (3H, s), 3.73, 4.01 (2H, AB, $J=12$ Hz), 4.06, 4.29 (2H, AB, $J=11$ Hz), 4.47 (1H, d, $J=7$ Hz), 4.52 (1H, dd, $J=6, 7$ Hz), 5.98 (1H, d, $J=6$ Hz), 7.28 (1H, s), 7.43 (2H, d, $J=8$ Hz), 7.81 (2H, d, $J=8$ Hz).

[0078] (6) 化合物7の合成

窒素気流下、化合物6 (200 mg, 0.29 mmol) のピリジン溶液 (3 ml) に氷冷下、無水トリフルオロメタンスルホン酸 (0.15 ml, 0.88 mmol)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン (7 mg, 0.06 mmol) を加え、室温で7.5時間撹拌した。反応溶液に水を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体7 (0.29 g) を精製せず、次の反応に用いた。

[0079] [数6]

IR ν_{\max} (KBr): 3178, 3069, 2948, 2874, 1695, 1465, 1424, 1365, 1281, 1214, 1143, 1088, 1038 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.81-1.26 (28H, m), 1.92 (3H, s), 2.46 (3H, s), 3.77, 4.16 (2H, AB, $J=12$ Hz), 4.15, 4.42 (2H, AB, $J=10$ Hz), 5.42 (1H, d, $J=7$ Hz), 5.45 (1H, d, $J=7$ Hz), 6.89 (1H, s), 7.37 (2H, d, $J=8$ Hz), 7.82 (2H, d, $J=8$ Hz), 7.92 (1H, s).

[0080] (7) 化合物8の合成

窒素気流下、前反応で得られた粗成績体7 (0.29 g) のアセトニトリル溶液 (3 ml) に、室温でN-ヒドロキシフタルイミド (67 mg, 0.41 mmol)、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (61 l, 0.41 mmol) を加え、室温で12時間撹拌した。反応溶液をジクロロメタンで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム) により精製し、化合物8 (0.15 g, 61% from 6 in 2 steps) を黄色固体として得た。

[0081] [数7]

mp 109-111°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.99-1.31 (28H, m), 1.87 (3H, s), 1.42 (3H, s), 3.88, 4.19 (2H, AB, $J=13$ Hz), 4.41, 4.91 (2H, AB, $J=12$ Hz), 4.77 (1H, d, $J=6$ Hz), 4.80 (1H, d, $J=6$ Hz), 6.00 (1H, s), 7.32-7.37 (3H, m), 7.74-7.90 (6H, m).

[0082] (8) 化合物9の合成

化合物8 (1.16 g, 1.40 mmol) のエタノール溶液 (35 ml) に、ヒドラジーン水和物 (0.12 ml, 2.38 mmol) を加え、室温で10分間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去した後、濾過し、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体9 (0.93 g) は精製せず、次の反応に用いた。

[0083] [数8]

mp 117-119°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87-1.09 (28H, m), 1.92 (3H, d, $J = 1$ Hz), 2.45 (3H, s), 3.83, 3.91 (2H, AB, $J = 12$ Hz), 4.22, 4.57 (2H, AB, $J = 16$ Hz), 4.41 (1H, dd, $J = 1, 7$ Hz), 4.80 (1H, d, $J = 7$ Hz), 5.35 (1H, d, $J = 1$ Hz), 5.81 (1H, br), 7.12 (1H, d, $J = 1$ Hz), 7.33 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.81 (2H, d, $J = 8$ Hz), 8.75 (1H, s).

[0084] (9) 化合物10の合成

窒素気流下、前反応で得られた粗成績体9 (0.93 g) の塩化メチレン溶液 (15 ml) に氷冷下、飽和重曹水 (4.0 ml, 4.2 mmol)、クロロギ酸ベンジル (0.30 ml, 2.1 mmol) を加え、1時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン: 酢酸エチル = 4:1) により精製し、化合物10 (0.92 g, 94% from 8 in 2 steps) を白色固体として得た。

[0085] [数9]

mp 82-84°C. IR ν_{max} (KBr): 3319, 3059, 2948, 2874, 1691, 1464, 1365, 1245, 1180, 1098, 1034 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.86 (28H, m), 1.87 (3H, s), 2.43 (3H, s), 3.80, 3.88 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.25, 4.53 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 4.72 (1H, d, $J = 6$ Hz), 5.02 (1H, d, $J = 6$ Hz), 5.15, 5.20 (2H, AB, $J = 12$ Hz), 5.37 (1H, s), 7.31 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.34 (5H, s), 7.80 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7.95 (1H, s), 8.48 (1H, s).

[0086] (10) 化合物11の合成

窒素気流下、水素化ナトリウム (60% in oil, 0.55 g, 13.7 mmol) のテトラヒドロフラン懸濁液 (25 ml) に氷冷下、化合物10 (3.81 g, 4.57 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (15 ml) を滴下し、1時間攪拌した後、室温で5時間攪拌した。飽和シュウ酸水溶液で中

和後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム→クロロホルム:メタノール=100:1)により精製し、化合物11(2.87 g, 95%)を白色固体として得た。

[0087] [数10]

mp 61-64°C. IR ν_{\max} (KBr): 3178, 3026, 2941, 2864, 1697, 1463, 1271, 1221, 1164, 1073 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.80-1.12 (28H, m), 1.92 (3H, s), 3.62, 3.85 (2H, AB, $J=12$ Hz), 3.68, 4.11 (2H, AB, $J=13$ Hz), 4.11 (1H, d, $J=4$ Hz), 4.55 (1H, d, $J=4$ Hz), 5.21, 5.28 (2H, AB, $J=12$ Hz), 5.98 (1H, s), 7.30-7.44 (5H, m), 7.61 (1H, s), 8.80 (1H, br).

[0088] (11) 化合物12の合成

窒素気流下、前反応で得られた粗成績体11 (0.35 mg, 0.53 mmol) の塩化メチレン溶液(10 ml)に氷冷下、1M三塩化ホウ素ヘキサン溶液(5.29 ml, 5.29 mmol)を加え、1時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール=50:1)により精製し、化合物12(0.27 g, 96%)を白色固体として得た。

[0089] [数11]

mp 102-104°C. IR ν_{\max} (KBr): 4326, 3178, 3059, 2947, 2864, 1698, 1564, 1464, 1270, 1043 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.99-1.25 (28H, m), 1.93 (3H, s), 2.54, 3.68 (2H, AB, $J=13$ Hz), 3.67, 4.06 (2H, AB, $J=13$ Hz), 4.10 (1H, d, $J=2$ Hz), 4.36 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.17 (1H, s), 7.73 (1H, s), 8.71 (1H, br).

[0090] (12) 化合物13の合成

化合物12(0.19 g, 0.36 mmol)の1M p-トルエンスルホン酸ピリジニウム-メタノール溶液(3.6 ml)に、室温にて20%ホルムアルデヒド水溶液(0.06 ml, 0.40 mmol)を加え、10分間攪拌した。さらに、氷冷下シアン化水素化ホウ素ナトリウム(45 mg, 0.72 mmol)を加え、1時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで抽出し、水、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:酢酸エチル=

2:1)にて精製し、化合物13(0.19 g, 100%)を白色固体として得た。

[0091] [数12]

IR ν_{\max} (KBr): 2947, 2868, 1695, 1464, 1267, 1163, 1038 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.94-1.12 (28H, m), 1.92 (3H, d, $J = 1$ Hz), 2.60, 2.91 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 2.76 (3H, s), 3.67, 4.08 (2H, AB, $J = 13$ Hz), 3.95 (1H, d, $J = 3$ Hz), 4.33 (1H, d, $J = 3$ Hz), 6.24 (1H, s), 7.73 (1H, d, $J = 1$ Hz), 8.56 (1H, br).

[0092] (13) 化合物14の合成

化合物13(46 mg, 0.085 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(2 ml)にフッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム(1M inテトラヒドロフラン, 0.17 ml, 0.17 mmol)を加え、室温で5分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:メタノール=15:1)により精製し、化合物14(25 mg, 100%)を白色固体として得た。

[0093] [数13]

mp 101-103°C. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 1.85 (3H, d, $J = 1$ Hz), 2.71 (3H, s), 2.71, 2.88 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 3.69, 3.76 (2H, AB, $J = 12$ Hz), 3.94 (1H, d, $J = 3$ Hz), 4.23 (1H, d, $J = 3$ Hz), 6.21 (1H, s), 7.99 (1H, d, $J = 1$ Hz).

[0094] (14) 化合物15の合成

化合物14(0.16 g, 0.54 mmol)のピリジン溶液(10 ml)に塩化4,4'-ジメトキシトリチル(0.22 g, 0.64 mmol)を加え、室温で12時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1%トリエチルアミン含有*n*-ヘキサン:酢酸エチル=1:2→酢酸エチル:メタノール=30:1)にて精製し、化合物15(0.30 g, 93%)を白色固体として得た。

[0095] [数14]

mp 133-134°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.45 (3H, d, $J = 1$ Hz), 2.52 (1H, d, $J = 9$ Hz), 2.72 (3H, s), 2.77 (2H, s), 3.32, 3.37 (2H, AB, $J = 11$ Hz), 3.79 (6H, s), 4.23 (1H, dd, $J = 3, 9$ Hz), 4.35 (1H, d, $J = 3$ Hz), 6.35 (1H, s), 6.84 (4H, d, $J = 8$ Hz), 7.22-7.46 (9H, m), 7.75 (1H, d, $J = 1$ Hz), 8.25 (1H, br).

[0096] (15) 化合物16の合成

化合物15 (0.17 g, 0.28 mmol) 及び4,5-ジシアノイミダゾール (40 mg, 0.34 mmol) のアセトニトリル溶液 (6 ml) に、2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト (0.13 ml, 0.42 mmol) を加え、室温で4時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1%トリエチルアミン含有n-ヘキサン:酢酸エチル=1:1)、ついで再沈澱 (酢酸エチル-ヘキサン) により精製し、化合物16 (0.20 g, 88%) を白色固体として得た。

[0097] [数15]

mp 65-65°C. ^{31}P -NMR (acetone- d_6) δ : 148.69, 149.82.

[0098] (16) 化合物17の合成

窒素気流下、1,2,4-トリアゾール (278 mg, 4.03 mmol) のアセトニトリル懸濁液 (9 ml) に、氷冷下、塩化ホスホリル (86 ml, 0.92 mmol) を加え10分間激しく攪拌し、さらにトリエチルアミン (0.64 ml, 4.62 mmol) を加え35分間攪拌した。氷冷下、化合物16 (95 mg, 0.12 mmol) のアセトニトリル溶液 (3 ml) を加え、5.5時間攪拌した後、室温でさらに2.5時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン:酢酸エチル=1:2)、ついで再沈澱 (酢酸エチル-ヘキサン) により精製し、化合物17 (83 mg, 83%) を白色固体として得た。

[0099] [数16]

mp 107-109°C. ^{31}P -NMR (acetone- d_6) δ : 148.24, 149.91.

[0100] (17) 化合物18の合成

化合物12 (100 mg, 0.19 mmol) およびトリエチルアミン (32 ml, 0.12 mmol) の塩化メチレン溶液 (3 ml) に、氷冷下、塩化フェノキシアセチル (29 ml, 0.21 mmol) を加え30

分間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン:酢酸エチル=2:1) により精製し、化合物18 (115 mg, 92%) を白色固体として得た。

[0101] [数17]

mp 124-126°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.02-1.13 (28H, m), 1.92 (3H, s), 3.49 (1H, AB, *J*= 13 Hz), 3.73 (1H, AB, *J*= 14 Hz), 4.16 (1H, d, *J*= 3 Hz), 4.18 (1H, AB, *J*= 13 Hz), 4.23 (1H, AB, *J*= 14 Hz), 4.57 (1H, d, *J*= 3 Hz), 4.91 (1H, AB, *J*= 16 Hz), 5.00 (1H, AB, *J*= 16 Hz), 5.97 (1H, s), 6.92-7.00 (3H, m), 7.24-7.30 (2H, m), 7.60 (1H, s), 9.59 (1H, brs).

[0102] (18) 化合物19の合成

窒素気流下、室温で化合物18 (0.34 g, 0.51 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (10 ml) にフッ化テトラn-ブチルアンモニウム (1 Mテトラヒドロフラン溶液, 1.0 ml, 1.0 mmol) を加え、5分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:メタノール=15:1) により精製し、化合物19 (0.20 g, 95%) を白色固体として得た。

[0103] [数18]

mp 144-146°C. ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 1.85 (3H, s), 3.53 (1H, AB, *J*= 13 Hz), 3.77 (1H, AB, *J*= 13 Hz), 3.85 (1H, AB, *J*= 13 Hz), 4.18 (1H, AB, *J*= 13 Hz), 4.20 (1H, d, *J*= 2 Hz), 4.60 (1H, d, *J*= 2 Hz), 4.93 (1H, AB, *J*= 16 Hz), 5.04 (1H, AB, *J*= 16 Hz), 6.05 (1H, s), 6.91-6.97 (3H, m), 7.23-7.28 (2H, m), 7.90 (1H, s).

[0104] (19) 化合物20の合成

窒素気流下、室温で化合物19 (0.17 g, 0.41 mmol) のピリジン溶液 (8 ml) に塩化4, 4'-ジメトキシトリチル (0.25 g, 0.73 mmol) を加え、7時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1%トリエチルアミン含有n-ヘキサン:酢酸エチル=1:1→酢酸エチル:メタノール=50:1) により精製し、化合物20 (0.25 g, 86%) を白色固体として得た。

[0105] [数19]

mp 144-145°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.44 (3H, s), 2.65 (1H, br), 3.40 (1H, AB, $J = 11$ Hz), 3.44 (1H, AB, $J = 13$ Hz), 3.52 (1H, AB, $J = 11$ Hz), 3.80 (6H, s), 4.23 (1H, AB, $J = 13$ Hz), 4.44 (1H, d, $J = 3$ Hz), 4.63 (1H, d, $J = 3$ Hz), 4.86 (1H, AB, $J = 16$ Hz), 4.99 (1H, AB, $J = 16$ Hz), 6.04 (1H, s), 6.83-6.98 (7H, m), 7.25-7.43 (11H, m), 7.65 (1H, s), 8.38 (1H, br).

[0106] (20) 化合物21の合成

化合物20 (0.25 g, 0.35 mmol) 及び4,5-ジシアノイミダゾール (41 mg, 0.35 mmol) のアセトニトリル溶液 (7 ml) に、2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト (0.13 ml, 0.42 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1% トリエチルアミン含有 *n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 1:1)、ついで再沈澱 (酢酸エチル-ヘキサン) により精製し、化合物21 (0.27 g, 85%) を白色固体として得た。

[0107] [数20]

mp 107-109°C. $^{31}\text{P-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 149.79, 151.04.

[0108] (21) 化合物22の合成

窒素気流下、1,2,4-トリアゾール (229 mg, 3.32 mmol) のアセトニトリル懸濁液 (10 ml) に、氷冷下、塩化ホスホリル (71 ml, 0.76 mmol) を加え10分間激しく攪拌し、さらにトリエチルアミン (0.53 ml, 3.81 mmol) を加え35分間攪拌した。氷冷下、化合物21 (90 mg, 0.10 mmol) のアセトニトリル溶液 (2 ml) を加え、5時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体を再沈澱 (酢酸エチル-ヘキサン) により精製し、化合物22 (90 mg, 95%) を白色固体として得た。

[0109] [数21]

mp 104-106°C. $^{31}\text{P-NMR}$ (acetone- d_6) δ : 149.58, 151.29.

[0110] (22) 化合物23の合成

窒素気流下、1,2,4-トリアゾール(1.41 g, 20.4 mmol)のアセトニトリル懸濁液(61 ml)に、氷冷下、塩化ホスホリル(0.44 ml, 4.67 mmol)を加え10分間激しく攪拌し、さらにトリエチルアミン(3.27 ml, 23.4 mmol)を加え35分間攪拌した。氷冷下、化合物11(409 mg, 0.62 mmol)のアセトニトリル溶液(3 ml)を加え、2時間攪拌した後、室温でさらに3時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体23(497 mg)は精製せず、次の反応に用いた。

[0111] [数22]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.92-1.12 (28H, m), 2.47 (3H, s), 3.66 (1H, AB, $J = 12$ Hz), 3.72 (1H, AB, $J = 13$ Hz), 3.90 (1H, AB, $J = 12$ Hz), 4.06 (1H, d, $J = 3$ Hz), 4.16 (1H, AB, $J = 13$ Hz), 4.73 (1H, d, $J = 3$ Hz), 6.11 (1H, s), 7.25-7.48 (5H, m), 8.12 (1H, s), 8.24 (1H, s), 9.32 (1H, s).

[0112] (23) 化合物24の合成

化合物23(497 mg)の1,4-ジオキサン溶液(10.6 ml)に、室温で28%アンモニア水溶液(1.76 ml)を加え、2時間攪拌した。溶媒を減圧流去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール=30:1)により精製し、化合物24(343 mg, 84% from 11 in 2 steps)を白色固体として得た。

[0113] [数23]

mp 137-139°C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.93-1.11 (28H, m), 2.03 (3H, s), 3.62 (1H, AB, $J = 12$ Hz), 3.69 (1H, AB, $J = 13$ Hz), 3.85 (1H, AB, $J = 12$ Hz), 4.03 (1H, d, $J = 3$ Hz), 4.11 (1H, AB, $J = 13$ Hz), 4.59 (1H, d, $J = 3$ Hz), 5.24 (2H, s), 6.03 (1H, s), 7.26-7.45 (5H, m), 7.74 (1H, s).

[0114] (24) 化合物25の合成

化合物24(175 mg, 0.26 mmol)の塩化メチレン溶液(2.6 ml)に、氷冷下、飽和重曹水(0.8 ml, 0.79 mmol)と塩化ベンゾイル(92 ml, 0.79 mmol)を加え、2時間攪拌した後、室温でさらに1.5時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム)により精製し、化合物25(161 mg, 80%)を白色固体として得た。

[0115] [数24]

mp 216-218°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.99-1.12 (28H, m), 2.12 (3H, s), 3.63 (1H, AB, *J* = 12 Hz), 3.70 (1H, AB, *J* = 13 Hz), 3.87 (1H, AB, *J* = 12 Hz), 4.11 (1H, d, *J* = 3 Hz), 4.13 (1H, AB, *J* = 13 Hz), 4.59 (1H, d, *J* = 3 Hz), 5.22 (1H, AB, *J* = 12 Hz), 5.29 (1H, AB, *J* = 12 Hz), 6.02 (1H, s), 7.31-7.53 (8H, m), 7.88 (1H, s), 8.30-8.33 (2H, m).

[0116] (25) 化合物26の合成

窒素気流下、化合物25 (115 mg, 0.15 mmol) の塩化メチレン溶液 (7.5 ml) に、-78 °C 冷却下、1 M 三塩化ホウ素ヘキサン溶液 (1.35 ml, 1.35 mmol) を加え、1.5 時間攪拌し、氷冷下でさらに2.5 時間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体26 (90 mg) は精製せず、次の反応に用いた。

[0117] [数25]

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.99-1.13 (28H, m), 2.14 (3H, s), 2.57 (1H, AB, *J* = 13 Hz), 3.69 (1H, AB, *J* = 14 Hz), 3.70 (1H, AB, *J* = 13 Hz), 4.09 (1H, AB, *J* = 14 Hz), 4.11 (1H, d, *J* = 3 Hz), 4.42 (1H, d, *J* = 3 Hz), 6.22 (1H, s), 7.42-7.56 (3H, m), 7.91 (1H, s), 8.30-8.33 (2H, m).

[0118] (26) 化合物27の合成

窒素気流下、化合物26 (90 mg) とトリエチルアミン (25 ml, 0.18 mmol) の塩化メチレン溶液 (1.5 ml) に、氷冷下、塩化フェノキシアセチル (23 ml, 0.17 mmol) を加え45 分間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン:酢酸エチル = 2:1) により精製し、化合物27 (49 mg, 42% from 23 in 2 steps) を白色固体として得た。

[0119] [数26]

mp 224-226°C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.99-1.14 (28H, m), 2.13 (3H, s), 3.52 (1H, AB, *J* = 13 Hz), 3.75 (1H, AB, *J* = 13 Hz), 4.17 (1H, AB, *J* = 13 Hz), 4.18 (1H, d, *J* = 3 Hz), 4.23 (1H, AB, *J* = 13 Hz), 4.61 (1H, d, *J* = 3 Hz), 4.92 (1H, AB, *J* = 16 Hz), 5.05 (1H, AB, *J* = 16 Hz), 6.01 (1H, s), 6.95-7.02 (3H, m), 7.29 (2H, m), 7.42-7.57 (4H, m), 7.79 (1H, s), 8.30-8.33 (2H, m).

[0120] (27) 化合物28の合成

窒素気流下、室温で化合物27 (45 mg, 0.06 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1.2 ml) に、フッ化テトラ n -ブチルアンモニウム (1 Mテトラヒドロフラン溶液, 0.12 ml, 0.12 mmol) を加え、10分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン:酢酸エチル=1:1) により精製し、化合物28 (31 mg, 100%) を白色固体として得た。

[0121] [数27]

mp 148-150°C. $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5) δ : 1.94 (3H, s), 4.08 (1H, AB, J = 13 Hz), 4.23 (1H, AB, J = 12 Hz), 4.30 (1H, AB, J = 12 Hz), 4.73 (1H, AB, J = 13 Hz), 5.21 (1H, AB, J = 16 Hz), 5.28 (1H, d, J = 3 Hz), 5.42 (1H, AB, J = 16 Hz), 5.42 (1H, d, J = 3 Hz), 6.61 (1H, s), 6.95-7.00 (1H, m), 7.27-7.36 (4H, m), 7.45-7.54 (3H, m), 7.73 (1H, s), 8.54-8.56 (2H, m).

[0122] [実施例2] オリゴヌクレオチド類縁体の合成及び精製

(1) 2',4'-BNA^{NC} 修飾オリゴヌクレオチドの合成

2',4'-BNA^{NC}モノマーユニットを含有するオリゴヌクレオチド類縁体(1)ー(22)は、標準的なホスホロアミダイトプロトコールに従って、核酸自動合成機ExpediteTM 8909 (ABI社製)により0.2 mmol スケールで合成した。アミダイトと5'-末端の水酸基とのカップリング時間は、天然のヌクレオシドアミダイトでは94秒、2',4'-BNA^{NC}アミダイト(16、17および21)では300秒に設定した。

[0123] 5'-末端がDMTr基保護され、固相支持された状態の2',4'-BNA^{NC}修飾オリゴヌクレオチドに対し、それぞれ、28%アンモニア水によるカラムからの切り出し(1.5h)を行い、切り出したオリゴヌクレオチド類縁体を28%アンモニア水中、16h、60°Cで反応させ、すべての保護基の脱保護を行った。

[0124] NAP-10 カラムによる簡易精製を行い、分画した各フラクションをUV分析した。

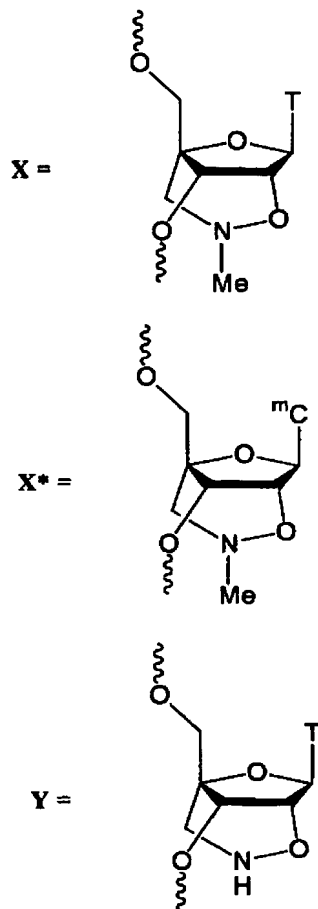
[0125] UV測定の結果をもとに、オリゴを含むフラクションを凍結乾燥し、さらに逆相HPLC(WakoPak^R WS-DNA column, 10.0 mm x 250 mm)により精製した(条件:0.1Mトリエチルアンモニウム酢酸バッファー(pH7.0)中、3 ml/min.で30分の8-16%アセトニトリルのグラディエント)。合成されたオリゴヌクレオチド類縁体の純度は、逆相HPLC(WakoPak^R WS-DNA column, 4.6 mm x 250 mm)により確認した(条件:0.1Mトリエチルアンモニウム酢酸バッファー(pH7.0)中、1 ml/min.で30分の8-16%アセトニトリルの

グラディエント)。また、分子量は、MALDI-TOF-MASS測定により決定した。

[0126] 以下に合成したオリゴヌクレオチド類縁体(1)～(22)を示す。

[0127] [化7]

- ① 5'-GCGTTXTTTGCT-3'
- ② 5'-GCGTTXTXTGCT-3'
- ③ 5'-GCGXTXTXTGCT-3'
- ④ 5'-GCGTTXXXTGCT-3'
- ⑤ 5'-GCGXXXXXXGCT-3'
- ⑥ 5'-TTTT^mCTXT^mCT^mCT^mCT-3'
- ⑦ 5'-TTTTX^mCTXT^mCX^mCT^mCT-3'
- ⑧ 5'-TTTT^mCXXX^mCT^mCT^mCT-3'
- ⑨ 5'-XTXTX^mCXTX^mCX^mCX^mCT-3'
- ⑩ 5'-TXTTX^mCTXT^mCX^mCTX^{*}T-3'
- ⑪ 5'-XTTTX^mCTTX^mCT^mCX^mCT-3'
- ⑫ 5'-TTTTTTTTXT-3'
- ⑬ 5'-GCGTTYTTTGCT-3'
- ⑭ 5'-GCGTTYTYTGCT-3'
- ⑮ 5'-GCGYTYTYTGCT-3'
- ⑯ 5'-GCGTTYYYTGCT-3'
- ⑰ 5'-GCGYYYYYYGCT-3'
- ⑱ 5'-TTTT^mCTYT^mCT^mCT^mCT-3'
- ⑲ 5'-TTTTY^mCTYT^mCY^mCT^mCT-3'
- ⑳ 5'-TTTT^mCYYY^mCT^mCT^mCT-3'
- (21) 5'-YTYTY^mCYYY^mCY^mCY^mCT-3'
- (22) 5'-TTTTTTTTYT-3'



[0128] 得られた2',4'-BNA^{NC}修飾オリゴヌクレオチドの収量、収率を以下に示す。

[0129] [表1]

Oligonucleotides	収量 (nmol)	収率 (%)
① 5'-GCGTTXTTGTGCT-3'	94.91	47.5
② 5'-GCGTTXTGTGCT-3'	118.67	59.3
③ 5'-GCGXTXTGTGCT-3'	126.12	63.1
④ 5'-GCGTTXXGTGCT-3'	66.94	33.5
⑤ 5'-GCGXXXXXXGTGCT-3'	99.40	49.7
⑥ 5'-TTTT ^m CTXT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	72.44	36.2
⑦ 5'-TTTT ^m CTXT ^m CX ^m CT ^m CT-3'	61.07	30.6
⑧ 5'-TTTT ^m CXXX ^m CT ^m CT ^m CT-3'	60.40	30.2
⑨ 5'-XTXTX ^m CXTX ^m CX ^m CX ^m CT-3'	41.60	20.8
⑩ 5'-TXTT ^m CTXT ^m CX ^m CTX ^m T-3'	25.40	12.7
⑪ 5'-XTTT ^m CTTX ^m CT ^m CX ^m CT-3'	81.80	40.9
⑫ 5'-TTTTTTTTXT-3'	100.13	50.1

[0130] 更に、合成した2',4'-BNA^{NC}修飾オリゴヌクレオチドのMALDI-TOF MS測定結果を下記の表に示す。

[0131] [表2]

Oligonucleotides	Calcd. For (M-H) ⁻	Found (M-H) ⁻
① 5'-GCGTTXTTGTGCT-3'	3689.47	3688.52
② 5'-GCGTTXTGTGCT-3'	3746.52	3746.89
③ 5'-GCGXTXTGTGCT-3'	3803.57	3804.93
④ 5'-GCGTTXXXGTGCT-3'	3803.57	3803.18
⑤ 5'-GCGXXXXXXGTGCT-3'	3974.73	3975.31
⑥ 5'-TTTTT ^m CTXT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	4553.11	4552.67
⑦ 5'-TTTTX ^m CTXT ^m CX ^m CT ^m CT-3'	4667.21	4667.36
⑧ 5'-TTTTT ^m CXXX ^m CT ^m CT ^m CT-3'	4667.21	4666.86
⑨ 5'-XTXTX ^m CXTX ^m CX ^m CX ^m CT-3'	4895.42	4896.42
⑩ 5'-TXTTX ^m CTXT ^m CX ^m CTX ^m T-3'	4781.32	4781.18
⑪ 5'-XTTIX ^m CTTX ^m CT ^m CX ^m CT-3'	4724.26	4723.73
⑫ 5'-TTTTTTTTXT-3'	3036.06	3036.36
⑬ 5'-GCGTTYTTGTGCT-3'	3675.44	3675.80
⑭ 5'-GCGTTYTYTGCT-3'	3718.47	3717.15
⑮ 5'-GCGYTYTYTGCT-3'	3761.49	3762.64
⑯ 5'-GCGTTYYYTGCT-3'	3761.49	3761.24
⑰ 5'-GCGYYYYYYGTGCT-3'	3890.57	3890.62
⑱ 5'-TTTTT ^m CTYT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	4539.08	4540.11
⑲ 5'-TTTTY ^m CTYT ^m CY ^m CT ^m CT-3'	4625.13	4625.74
⑳ 5'-TTTTT ^m CYYY ^m CT ^m CT ^m CT-3'	4625.13	4625.71
(21) 5'-YTYTY ^m CYYY ^m CY ^m CY ^m CT-3'	4797.23	4797.80
(22) 5'-TTTTTTTTYT-3'	3022.03	3021.93

[0132] [実験例1] 2',4'-BNA^{NC}修飾オリゴヌクレオチドの融解温度(T_m)測定(二重鎖形成能評価)

実施例で合成したオリゴヌクレオチド類縁体(1)～(5)および(13)～(17)(アンチセンス鎖)と天然DNAあるいはRNAオリゴヌクレオチドのセンス鎖とをアニーリング処理したものの融解温度(T_m)を測定することにより、アンチセンス鎖の二重鎖形成能を調べた。

[0133] 終濃度をそれぞれ、NaCl 100mM、リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)10mM、ア

ンチセンス鎖4 μ M、センス鎖4 μ Mとしたサンプル溶液(500 μ L)を沸騰水中に浴し、10時間かけて室温まで冷却した。分光光度計(Beckman, DU-650)のセル室内に結露防止のために窒素気流を通し、サンプル溶液を5℃まで徐々に冷却し、さらに20分間10℃に保った後、測定を開始した。温度は90℃まで毎分0.5℃ずつ上昇させ、260nmにおける紫外部吸収を測定した。

[0134] 結果を表3、表4に示す。

[0135] [表3]

DNA鎖(5'-AGCAAAAAACGC-3')に対する二重鎖形成能 (T _m 値評価) : °C		
アンチセンス鎖	T _m	Δ T _m /mod.
5'-GCGTTTTTTGCT-3'	50	Natural
① 5'-GCGTTXTTTGCT-3'	49	-1
② 5'-GCGTTXTTGCT-3'	49	-0.5
③ 5'-GCGXTXTTGCT-3'	51	-0.3
④ 5'-GCGTTXXTGCT-3'	50	0
⑤ 5'-GCGXXXXXXGCT-3'	61	+1.8
⑬ 5'-GCGTTYTTTGCT-3'	51	+1
⑭ 5'-GCGTTYTYTGCT-3'	52	+1
⑮ 5'-GCGYTYTYTGCT-3'	55	+1.7
⑯ 5'-GCGTTYYYTGCT-3'	57	+2.3
⑰ 5'-GCGYYYYYYGCT-3'	73	+3.8

Conditions: 100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ buffer (pH7.2), [strand] = 4 μ M.
T_mは3回以上の実験の平均値

[0136] [表4]

RNA鎖(5'-AGCAAAAAACGC-3')に対する二重鎖形成能 (T _m 値評価) : °C		
アンチセンス鎖	T _m	Δ T _m /mod.
5'-GCGTTTTTTGCT-3'	45	Natural
① 5'-GCGTTXTTTGCT-3'	50	+5
② 5'-GCGTTXTTGCT-3'	56	+5.5
③ 5'-GCGXTXTTGCT-3'	63	+6
④ 5'-GCGTTXXTGCT-3'	59	+4.7
⑤ 5'-GCGXXXXXXGCT-3'	80	+5.8
⑬ 5'-GCGTTYTTTGCT-3'	51	+6
⑭ 5'-GCGTTYTYTGCT-3'	56	+5.5
⑮ 5'-GCGYTYTYTGCT-3'	64	+6.3
⑯ 5'-GCGTTYYYTGCT-3'	61	+5.3
⑰ 5'-GCGYYYYYYGCT-3'	83	+6.3

Conditions: 100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ buffer (pH7.2), [strand] = 4 μ M.
T_mは3回以上の実験の平均値

[0137] 以上より、本発明のヌクレオチド類縁体は、一本鎖DNA(センス鎖)に対する二重

鎖形成能に比較して一本鎖RNA(センス鎖)に対する二重鎖形成能が格段と高く、アンチセンス法に適するものと考えられる。

[実験例2] 2',4'-BNA^{NC}修飾オリゴヌクレオチドのT_m測定(三重鎖形成能評価)

実施例で合成したオリゴヌクレオチド類縁体(6)～(11)および(18)～(21)について、実験例1と同様の方法により、下記の標的2本鎖DNAとの三重鎖形成能を調べた。測定の際の塩濃度やpHについては各表の下に記載してある条件を用いた。

[0138] 結果および実験条件を表5に示す。

[0139] [表5-1]

表5—1. T_m values of 2',4'-BNA^{NC} oligonucleotides with dsDNA.

target : 5' - d (GCTAAAAAGAAAGAGAGATCG) - 3'	
3' - d (CGATTTTCTTTCTCTCTAGC) - 5'	
oligonucleotides	T _m (Δ T _m /modification) (°C)
5'-TTTTT ^m CTTT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	33
⑥ 5'-TTTTT ^m CTXT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	38 (+5.0)
⑦ 5'-TTTTX ^m CTXT ^m CX ^m CT ^m CT-3'	47 (+4.6)
⑧ 5'-TTTTT ^m CXXX ^m CT ^m CT ^m CT-3'	42 (+3.0)
⑨ 5'-XTXTX ^m CXTX ^m CX ^m CX ^m CT-3'	59 (+3.7)
⑩ 5'-TXTTX ^m CTXT ^m CX ^m CTX [*] T-3'	50 (+3.4)
⑪ 5'-XTTXX ^m CTTX ^m CT ^m CX ^m CT-3'	45 (+3.0)
⑬ 5'-TTTTT ^m CTYT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	44 (+11.0)
⑭ 5'-TTTTY ^m CTYT ^m CY ^m CT ^m CT-3'	60 (+9.0)
⑯ 5'-TTTTT ^m CYYY ^m CT ^m CT ^m CT-3'	59 (+8.7)
(21) 5'-YTYTY ^m CYTY ^m CY ^m CY ^m CT-3'	78 (+6.4)

Conditions : 140 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄ buffer (pH 7.0), each strand 1.5 μM, 5°C to 90°C (0.5°C/min). X*: 2',4'-BNA^{NC}(N-Me)-^mC

[0140] [表5-2]

表 5—2. T_m values of 2',4'-BNA^{NC} oligonucleotides with dsDNA.

target : 5' - d (GCTGCTAAAAAGAAAGAGAGATCGTCG) - 3'
 3' - d (CGACGATTTTCTTTCTCTCTAGCAGC) - 5'

oligonucleotides	T_m (ΔT_m /modification) (°C)
5'-TTTTT ^m CTTT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	43
⑥ 5'-TTTTT ^m CTXT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	49 (+6.0)
⑦ 5'-TTTTX ^m CTXT ^m CX ^m CT ^m CT-3'	61 (+6.0)
⑧ 5'-TTTTT ^m CXXX ^m CT ^m CT ^m CT-3'	54 (+3.6)
⑨ 5'-XTXTX ^m CXTX ^m CX ^m CX ^m CT-3'	>80 (>+5)
⑩ 5'-TXTTX ^m CTXT ^m CX ^m CTX ^m T-3'	63 (+4.0)
⑪ 5'-XTTXX ^m CTTX ^m CT ^m CX ^m CT-3'	59 (+4.0)
⑬ 5'-TTTTT ^m CTYT ^m CT ^m CT ^m CT-3'	55 (+12.0)
⑭ 5'-TTTTY ^m CTYT ^m CY ^m CT ^m CT-3'	73 (+10.0)
⑯ 5'-TTTTT ^m CYYY ^m CT ^m CT ^m CT-3'	71 (+9.3)
(21) 5'-YTYTY ^m CYTY ^m CY ^m CY ^m CT-3'	>80 (>+5)

Conditions : 140 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 7 mM Na₂HPO₄ buffer (pH 7.0), each strand 1.5 μM, 5°C to 90°C (0.5°C/min). X*:2',4'-BNA^{NC}(N-Me)-^mC

[0141] [表5-3]

表 5—3. Sequence selective triplex-formation of 2',4'-BNA^{NC} oligonucleotides.

5' - d (TTTT^mCTZT^mCT^mCT^mCT) - 3'
 target : 5' - d (GCTAAAAAGAMAGAGAGATCG) - 3'
 3' - d (CGATTTTCTNTCTCTCTAGC) - 5'

Z	M·N=	T_m ($\Delta T_m = T_{m(\text{mismatch})} - T_{m(\text{match})}$) (°C)			
		A·T	G·C	C·G	T·A
natural-T		43	21 (-22)	25 (-18)	18 (-25)
⑥ X [2',4'-BNA ^{NC} (N-Me)]		50	24 (-26)	22 (-28)	14 (-36)
⑯ Y [2',4'-BNA ^{NC} (N-H)]		55	30 (-25)	28 (-27)	25 (-30)

Conditions: 140 mM KCl, 7 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), each strand 1.5 μM, 5°C to 90°C (0.5°C/min). C: 2'-deoxy-5-methylcytidine.

[0142] 表5に示すように、本発明のオリゴヌクレオチド類縁体(6)ー(11)および(18)ー(2

1)には優れた三重鎖形成能が認められた。また配列選択性に関しても天然を上回っていることから、アンチージン法などにも極めて有用であると考えられる。

実験例3: 酵素耐性の測定

天然型 (DNAオリゴヌクレオチド) 及び非天然型の下記のオリゴヌクレオチドについて、オリゴヌクレオチドを3'側から分解するエキソヌクレアーゼに対する耐性を調べた。

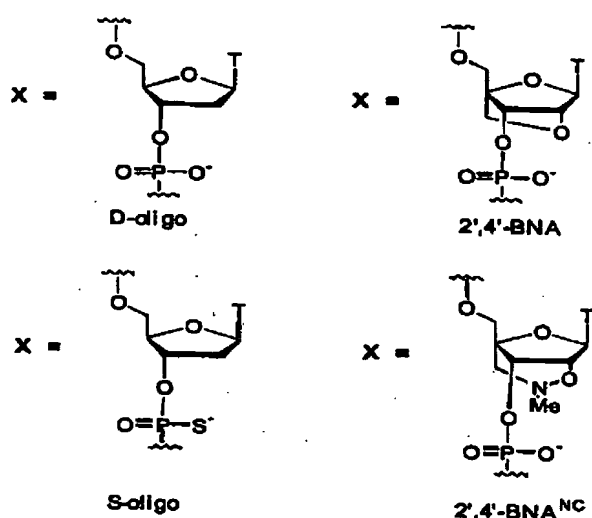
[0143] 1) 10mM MgCl_2 を含む 50mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) 400mL 中に、それぞれのオリゴヌクレオチド類と 3'-エキソヌクレアーゼの蛇毒ホスホジエステラーゼ (Boehringer Mannheim) がそれぞれ 25mg/mL と 0.5mg/mL になるように加えて 37°C に保つ。

[0144] 2) 一定時間後、HPLC で各オリゴヌクレオチド類の残存率を測定する。

[0145] 測定に用いたオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す。

[0146] 5'-TTTTTTTTXT-3'

[0147] [化8]



[0148] (このうち、XがDNAモノマーの場合、完全天然型DNAオリゴヌクレオチドであり、他のヌクレオチド類縁体を含むオリゴヌクレオチドは部分非天然型オリゴヌクレオチドである。また、Xが2',4'-BNA^{NC}(N-Me)であるオリゴヌクレオチド類縁体が本発明のオリゴヌクレオチド類縁体である。)

HPLCによる各オリゴヌクレオチド類の残存率の経時変化を表6及び図1に示した。

[0149] 表6及び図1中、「% of intact oligonucleotide」とは、0時点における未分解オリゴヌクレオチドに対する、測定時点における未分解オリゴヌクレオチドの残存率% (HPLC定量)を示す。

[0150] [表6]

酵素耐性評価

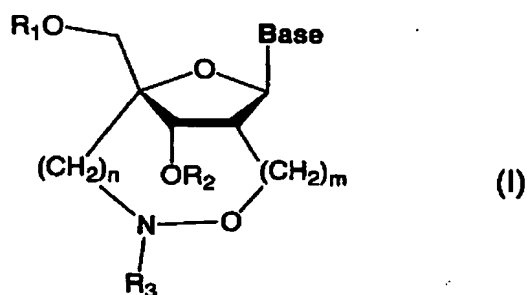
oligonucleotide	% of intact oligonucleotide					
	0min	5min	10min	20min	40min	90min
D-oligo	100	0	0	0	0	0
2',4'-BNA	100	37	24	5	1	0
S-oligo	100	94	92	91	83	70
2',4'-BNA ^{NC}	100	100	99	98	94	80

[0151] 表6および図1の結果から、本発明のオリゴヌクレオチド類縁体は、天然型及びその他の非天然型のオリゴヌクレオチドに比較して優れた酵素耐性を有していることがわかった。

請求の範囲

- [1] 下記一般式(I)で表される化合物及びその塩。

[化1]



(式中、Baseは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基もしくは芳香族炭化水素環基を示す。

R_1 、 R_2 は、同一又は異なって、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、または、 $-P(R_4)R_5$ [式中、 R_4 及び R_5 は、同一または異なって、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～5のアルキルチオ基、炭素数1～6のシアノアルコキシ基、または、炭素数1～5のアルキル基で置換されたアミノ基を示す。]を示す。

R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、及び機能性分子ユニット置換基を示す。

m は、0～2の整数、及び n は、1～3の整数である。)

- [2] R_1 が、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族あるいは芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲンもしくはシアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基、または、シリル基である、請求項1に記載の化合物及びその塩。
- [3] R_1 が、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメ

トキシトリチル基、または、tert-ブチルジフェニルシリル基である、請求項1に記載の化合物及びその塩。

- [4] R_2 が、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族あるいは芳香族スルホニル基、1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲンもしくはシアノ基でアリール環が置換された1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基である、請求項1〜3のいずれか1項に記載の化合物及びその塩。
- [5] R_2 が、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または、2-クロロフェニルもしくは4-クロロフェニルリン酸基である、請求項1〜3のいずれか1項に記載の化合物及びその塩。
- [6] R_3 が、水素原子、フェノキシアセチル基、炭素数1〜5のアルキル基、炭素数1〜5のアルケニル基、炭素数6〜14のアリール基、1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、メタンスルホニル基やp-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族あるいは芳香族スルホニル基又はアセチル基などの炭素数1〜5の脂肪族アシル基やベンゾイル基などの芳香族アシル基である請求項1〜5のいずれか1項に記載の化合物及びその塩。
- [7] R_3 の機能性分子ユニット置換基が、蛍光あるいは化学発光標識分子、核酸切断活性官能基、又は細胞内若しくは核内移行シグナルペプチドである請求項1〜6のいずれか1項に記載の化合物及びその塩。
- [8] Baseが、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、または下記 α 群から選択される置換基を有するプリン-9-イル基もしくは2-オキソ-ピリミジン-1-イル基である、請求項1〜7のいずれか1項に記載の化合物及びその塩。

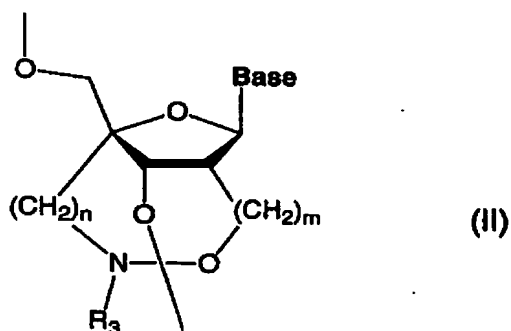
α 群: 水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1〜5のアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1〜5のアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、炭素数1〜5のアル

キル基で置換されたアミノ基、炭素数1-5のアルキル基、および、ハロゲン原子。

- [9] Baseが、6-アミノプリン-9-イル(即ち、アデニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル(即ち、グアニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、シトシニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、ウラシニル)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、チミニル)、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、5-メチルシトシニル)、または、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである、請求項1-8のいずれか1項に記載の化合物及びその塩。
- [10] mが0であり、nが1である、請求項1-9のいずれか1項に記載の化合物及びその塩。
- [11] 下記一般式(II)で表されるヌクレオシド類縁体の単位構造の1種以上を1または2個以上含有するDNAオリゴヌクレオチド又はRNAオリゴヌクレオチド類縁体としてのオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩。但し、オリゴヌクレオチド類

縁体中の各ヌクレオシド間の結合形態は、天然核酸と同じリン酸ジエステル結合 $[-O-P(O_2^-)O-]$ 以外にホスホロチオアート結合 $[-OP(O)(S^-)O-]$ を1又は2個以上含有していてもよく、また、前記の構造の1種以上を2個以上含有する場合は、当該構造間でBaseは同一または異なることができる。

[化2]



(式中、Baseは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基もしくは芳香族炭化水素環基を示す。

R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、及び機能性分子ユニット置換基を示す。

m は、0～2の整数、及び n は、1～3の整数である。

- [12] R_1 が、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族あるいは芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲンもしくはシアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基、または、シリル基である、請求項11に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩。
- [13] R_1 が、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、または、tert-ブチルジフェニルシリル基である、請求項11に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩。
- [14] R_2 が、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族あるいは芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ

、ハロゲンもしくはシアノ基でアリール環が置換された1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基である、請求項11〜13のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩。

- [15] R_2 が、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、メタンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、 $-P(O C_2 H_4 CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または、2-クロロフェニルもしくは4-クロロフェニルリン酸基である、請求項11〜13のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩。
- [16] R_3 が、水素原子、フェノキシアセチル基、炭素数1〜5のアルキル基、炭素数1〜5のアルケニル基、炭素数6〜14のアリール基、1〜3個のアリール基で置換されたメチル基、メタンスルホニル基やp-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族あるいは芳香族スルホニル基又はアセチル基などの炭素数1〜5の脂肪族アシル基やベンゾイル基などの芳香族アシル基である、請求項11〜15のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩。
- [17] R_3 の機能性分子ユニット置換基が、蛍光あるいは化学発光標識分子、核酸切断活性官能基、又は細胞内若しくは核内移行シグナルペプチドである請求項11〜16のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩。
- [18] Baseが、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、または下記 α 群から選択される置換基を有するプリン-9-イル基もしくは2-オキソ-ピリミジン-1-イル基である、請求項11〜17のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理学上許容される塩。

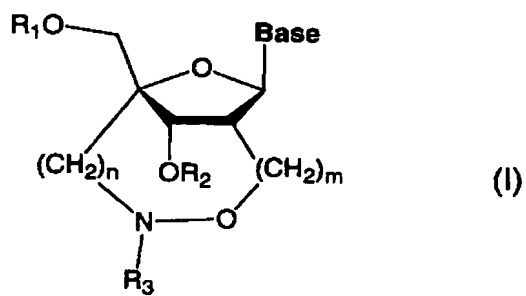
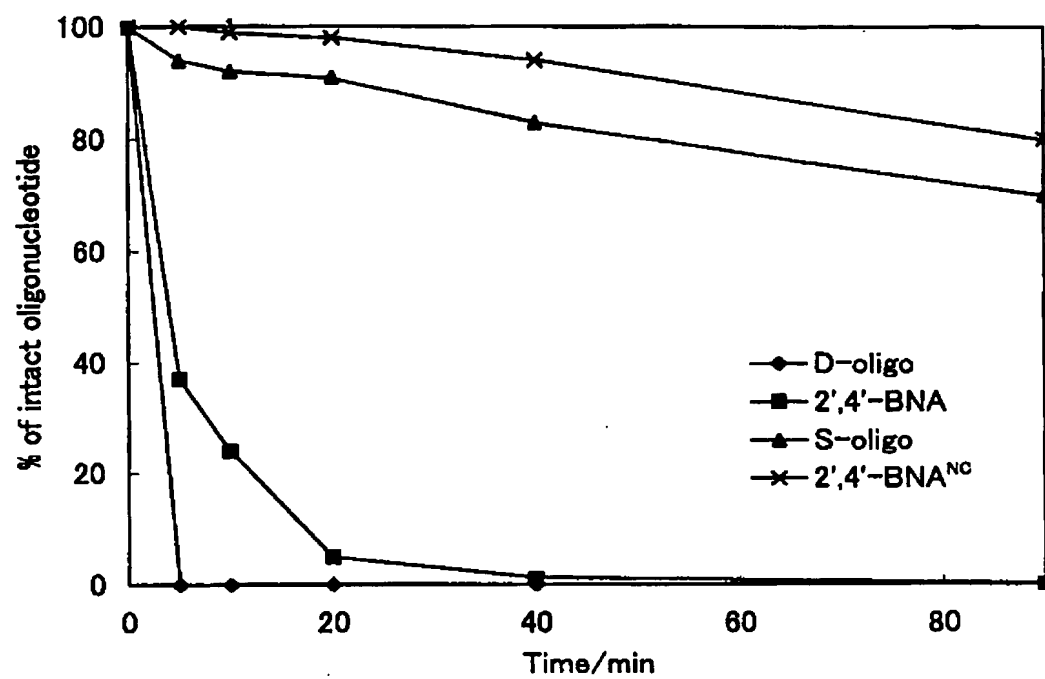
α 群: 水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1〜5のアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1〜5のアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、炭素数1〜5のアルキル基で置換されたアミノ基、炭素数1〜5のアルキル基、および、ハロゲン原子。

- [19] Baseが、6-アミノプリン-9-イル(即ち、アデニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-ク

ロロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル(即ち、グアニニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、シトシニル)、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、ウラシニル)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、チミニル)、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル(即ち、5-メチルシトシニル)、または、アミノ基が核酸合成の保護基で保護された4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである、請求項11-18のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理學上許容される塩。

- [20] mが0であり、nが1である、請求項11-19のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド類縁体またはその薬理學上許容される塩。

[図1]

酵素耐性評価 (2',4'-BNA^{NC} oligonucleotide, SVPDE 0.5 µg/ml)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07H19/04, 21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07H19/00-21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/68795 A1 (Takeshi IMANISHI), 21 August, 2003 (21.08.03), Claims (Family: none)	1-20
A	JP 2002-516256 A (ICN PHARMACEUTICALS, INC.), 04 June, 2002 (04.06.02), Claims & EP 1082012 A1 & WO 99/60855 A1 & CA 2333380 A & US 2003/0028013 A1	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 November, 2004 (05.11.04)

Date of mailing of the international search report
30 November, 2004 (22.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012173

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-521310 A (EXIQON A/S), 16 July, 2002 (16.07.02), Claims & WO 99/14226 A2 & CA 2303299 A & EP 1015469 A1 & US 2002/0068708 A1 & US 2003/0134808 A1 & US 2003/0144231 A1	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁷ C07H19/04, 21/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁷ C07H19/00-21/04		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 03/68795 A1(今西 武)2003. 08. 21, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-20
A	JP 2002-516256 A(アイ・シー・エヌ・フアーマシユーティカルズ ・インコーポレイテッド)2002. 06. 04, 特許請求の範囲 & EP 108201 2 A1 & WO 99/60855 A1 & CA 2333380 A & US 2003/0028013 A1	1-20
A	JP 2002-521310 A(エクシコン エ/エス)2002. 07. 16, 特許請求の 範囲 & WO 99/14226 A2 & CA 2303299 A & EP 1015469 A1 & US 20 02/0068708 A1 & US 2003/0134808 A1 & US 2003/0144231 A1	1-20
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
05. 11. 2004	30.11.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 関 政立	4C 8619
	電話番号 03-3581-1101	内線 3452